

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K16/28, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K16/28, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Webber K. et al. "Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-tac antibody: comparison with its single-chain analog", Molecular Immunology, Vol.32 (1995), pp.249-258	1-66
Y	JP, 5-304989, A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 19 November, 1993 (19.11.93) & US, 5750078, A & EP, 533199, A	1-66
Y	Moutel S. et al., "Generation and characterization of a mouse single-chain antibody fragment specific for disialoganglioside (GD2)", Hybridoma, Vol.16 (1997) pp.335-346	1-66
Y	Morrison SL. et al., "Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol.81 (1984) pp.6851-6855	1-66
Y	Jones PT. et al., "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse", Nature, Vol.321 (1986)	1-66

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 December, 2000 (19.12.00)Date of mailing of the international search report
30 January, 2001 (30.01.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06774

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	pp. 522-525	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BEST AVAILABLE COPY

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

6T
Translation
10/089,500

Applicant's or agent's file reference 1239	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06774	International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	Priority date (day/month/year) 30 September 1999 (30.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 16/28, C12P 21/08, C12N 15/13, 5/10, A61K 39/395, A61P 35/00		
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 29 March 2001 (29.03.01)	Date of completion of this report 29 November 2001 (29.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06774

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*☒ the international application as originally filed☐ the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:☐ contained in the international application in written form.☒ filed together with the international application in computer readable form.☐ furnished subsequently to this Authority in written form.☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:☐ the description, pages _____☐ the claims, Nos. _____☐ the drawings, sheets/fig _____5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/06774

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-66	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	3-35, 38-63, 65-66	YES
	Claims	1, 2, 36, 37, 64	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-66	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1, 2, 36, 37 and 64

Document 1 (JP, 5-304989, A) and Document 2 (S. Moutel et al., Hybridoma, Vol. 16, 1997, pp. 335-346) disclose monoclonal antibodies which react with ganglioside GD3. Binding an antibody to a radioactive isotope and/or protein, and pharmaceutical application thereof, are within the ordinary competence of a person skilled in the art; therefore, these feature in these inventions in the present application do not involve special inventive creativity.

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人: 書類記号 1239	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06774	国際出願日 (日.月.年) 29.09.00	優先日 (日.月.年) 30.09.99
出願人(氏名又は名称) 協和醗酵工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl¹ 16/28, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl¹ 16/28, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Webber K. et al. "Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-tac antibody: comparison with its single-chain analog" Molecular Immunology, 第32巻 (1995) p. 249-258	1-66
Y	JP, 5-304989, A (協和醗酵工業株式会社) 19.11月. 1993 (19.11.93) & US, 5750078, A & EP, 533199, A	1-66
Y	Moutel S. et al. "Generation and characterization of a mouse single-chain antibody fragment specific for	1-66

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.12.00

国際調査報告の発送日

30.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	disialoganglioside (GD2)" Hybridoma, 第16巻 (1997) p. 335-346	
Y	Morrison SL. et al. "Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 第81巻 (1984) p. 6851-6855	1-66
Y	Jones PT. et al. "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse" Nature, 第321巻 (1986)) p. 522-525	1-66

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 1239	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06774	国際出願日 (日.月.年) 29.09.00	優先日 (日.月.年) 30.09.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl ¹ C07K16/28, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P35/00		
出願人(氏名又は名称) 協和醗酵工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.03.01	国際予備審査報告を作成した日 29.11.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 深草 亜子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9548

~~BEST AVAILABLE COPY~~

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | |
|-------------------------------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

~~BEST AVAILABLE COPY~~

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-66

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

3-35, 38-63, 65-66

有

請求の範囲

1, 2, 36, 37, 64

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-66

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-2, 36, 37, 64

文献1: JP 5-304989 A

文献2: Moutel S. et al., Hybridoma, 第16巻, 1997, p. 335-346

には、ガングリオシドGD3に反応するモノクローナル抗体が記載されている。
そして、抗体に放射性同位元素や蛋白質等を結合させて医薬として用いることは当業者が適宜なし得る程度のことであり、本願発明におけるこれらの点には格別の困難性は認められない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 05 July 2001 (05.07.01)	
International application No. PCT/JP00/06774	Applicant's or agent's file reference 1239
International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	Priority date (day/month/year) 30 September 1999 (30.09.99)
Applicant HANAI, Nobuo et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
29 March 2001 (29.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer H. Zhou Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and
Administrative Instructions, Sections 402 and 409)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Ohtemachi 1-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 22 November 2000 (22.11.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1239	
International application No. PCT/JP00/06774	International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al	

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application.

1. ☐ **Correction of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: ,
the following priority claim has been corrected to read as follows:
 - ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
 - ☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
2. ☒ **Addition of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: 02 November 2000 (02.11.00),
the following priority claim has been added:
JP 06 April 2000 (06.04.00) 2000/105988
 - ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
 - ☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
3. ☐ As a result of the correction and/or addition of (a) priority claim(s) under items 1 and/or 2, the (earliest) priority date is:
4. ☐ **Priority claim considered not to have been made.**
 - ☐ The applicant failed to respond to the Invitation under Rule 26bis.2(a) (Form PCT/IB/316) within the prescribed time limit.
 - ☐ The applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a).
 - ☐ The applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.

The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(c) and the PCT Applicant's Guide, Volume I, Annex B2(II).
5. ☒ In case where multiple priorities have been claimed, the above item(s) relate to the following priority claim(s):
JP 06 April 2000 (06.04.00) 2000/105988
6. A copy of this notification has been sent to the receiving Office and
 - ☒ to the International Searching Authority (where the international search report has not yet been issued).
 - ☒ the designated Offices (which have already been notified of the receipt of the record copy).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Y. KUWAHARA Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

CORRECTED

PCT
VERSION

NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and
Administrative Instructions, Sections 402 and 409)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Ohtemachi 1-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 22 November 2000 (22.11.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1239	
International application No. PCT/JP00/06774	International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al	

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application.

1. ☐ **Correction of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: ,
the following priority claim has been corrected to read as follows:
 - ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
 - ☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
2. ☒ **Addition of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: 02 November 2000 (02.11.00),
the following priority claim has been added:
JP 06 April 2000 (06.04.00) 2000/105088
 - ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
 - ☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
3. ☐ As a result of the correction and/or addition of (a) priority claim(s) under items 1 and/or 2, the (earliest) priority date is:
4. ☐ **Priority claim considered not to have been made.**
 - ☐ The applicant failed to respond to the invitation under Rule 26bis.2(a) (Form PCT/IB/316) within the prescribed time limit.
 - ☐ The applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a).
 - ☐ The applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.

The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(c) and the PCT Applicant's Guide, Volume I, Annex B2(IB).
5. ☒ In case where multiple priorities have been claimed, the above item(s) relate to the following priority claim(s):
JP 06 April 2000 (06.04.00) 2000/105088
6. A copy of this notification has been sent to the receiving Office and
 - ☒ to the International Searching Authority (where the international search report has not yet been issued).
 - ☒ the designated Offices (which have already been notified of the receipt of the record copy).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Y. KUWAHARA
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 4 月 5 日 (05.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/23432 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07K 16/28, C12P 21/08, C12N 15/13, 5/10, A61K 39/395, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06774

(22) 国際出願日: 2000 年 9 月 29 日 (29.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/278291 1999 年 9 月 30 日 (30.09.1999) JP
特願 2000/105088 2000 年 4 月 6 日 (06.04.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 花井陳雄 (HANAI, Nobuo) [JP/JP]. 設楽研也 (SHITARA, Kenya) [JP/JP]. 中村和靖 (NAKAMURA, Kazuyasu) [JP/JP]. 丹羽倫平 (NIWA, Rinpei) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN TYPE COMPLEMENTARITY DETERMINING REGION TRANSPLANTATION ANTIBODY AGAINST GANGLIOSIDE GD3 AND DERIVATIVES OF ANTIBODY AGAINST GANGLIOSIDE GD3

(54) 発明の名称: ガングリオシド GD3 に対するヒト型相補性決定領域移植抗体およびガングリオシド GD3 に対する抗体の誘導体

(57) Abstract: A human type CDR transplantation antibody against ganglioside GD3 (hereinafter referred to as GD3); derivatives of the antiGD3 antibody with cytokines; and therapeutic and diagnostic utilization of the above-described antibody and derivatives.

(57) 要約:

本発明は、ガングリオシド GD3 (以下、GD3 と表記する) に対するヒト型 CDR 移植抗体、抗 GD3 抗体とサイトカインとの誘導体、ならびに該抗体および該誘導体の治療、診断上の用途に関する。

WO 01/23432 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

明 細 書

ガングリオシドGD3に対するヒト型相補性決定領域移植抗体およびガングリオシドGD3に対する抗体の誘導体

技術分野

本発明は、ガングリオシドGD3（以下、GD3と表記する）に特異的に反応するモノクローナル抗体および該抗体断片の誘導体、ならびにGD3に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体および該抗体断片に関する。本発明は更に、上記の誘導体、抗体および抗体断片をコードするDNA配列に関する。本発明は、該DNA配列を含んでなるベクターおよび該ベクターにより形質転換された細胞に関する。本発明は更に、該形質転換細胞を用いた上記の誘導体、抗体および抗体断片の製造方法、ならびに上記の誘導体、抗体および抗体断片を用いる癌の診断薬および治療薬に関する。

背景技術

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体をヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体（Human Anti Mouse Antibody：以下、HAMAと表記する）が誘導されることが知られている。HAMAは投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり〔ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー(J. Clin. Oncol.), 2, 881 (1984), ブラッド(Blood), 65, 1349 (1985), ザ・ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Natl. Cancer Inst.), 80, 932 (1988), プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 82, 1242 (1985)]、投与されたマウス抗体の血中からの消失を速め〔ザ・ジャーナル・オブ・ヌクレオチド・メディシン(J. Nucl. Med.), 26, 1011 (1985), ブラッド(Blood), 65, 1349 (1985), ザ・ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Natl. Cancer Inst.), 80, 937 (1988)]、マウス抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている〔ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 135, 1530 (1985), キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 46, 6489 (1986)]。

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物

の抗体をヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域 (Complementarity Determining Region: 以下、CDRと表記する) 移植抗体の様なヒト化抗体にすることが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域 (以下、V領域と表記する) がヒト以外の動物の抗体で、定常領域 (以下、C領域と表記する) がヒト抗体である抗体であり [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 81, 6851 (1984)]、ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体のV領域中のCDRのアミノ酸配列をヒト抗体の適切な位置に移植した抗体である [ネイチャー (Nature), 321, 522 (1986)]。これらのヒト化抗体は、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体に比較してヒトへの臨床応用上、様々な利点を有している。例えば、免疫原性および血中での安定性に関しては、ヒト型キメラ抗体では、ヒトに投与した場合、マウス抗体に比べて血中半減期が約6倍伸びたことが報告されている [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 86, 4220 (1989)]。ヒト型CDR移植抗体では、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が4~5倍伸びたことが報告されている [ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 147, 1352 (1991)]。即ち、ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。また、特に抗腫瘍抗体としての応用を考えた場合、抗体のFc領域 (抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域) を介した補体依存性細胞障害活性 (以下、CDC活性と表記する) や抗体依存性細胞障害活性 (以下、ADCC活性と表記する) 等の細胞障害活性の高さがその治療効果に重要であるが、こうした細胞障害活性に関しても、ヒトにおいてはヒト以外の動物の抗体のFc領域よりも、ヒト抗体のFc領域の方がヒト補体成分や、単核球、マクロファージ、NK細胞のFc受容体を細胞表面に有するヒトエフェクター細胞をより効率的に活性化できる為、より優れていることが報告されている。例えば、GD3に対するマウス抗体 (以下、抗GD3マウス抗体と表記する) は、ヒト抗体のFc領域を有するヒト型キメラ抗体 (以下、抗GD3キメラ抗体と表記する) に変換することにより、ヒトエフェクター細胞による腫瘍細胞障害活性が上昇することが報告されており [ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 144, 1382 (1990)]、また、CAMPATH-1抗原に対するヒト型CDR移植抗体についても同様の結果が報告されている [ネイチ

ャー(Nature), 332, 323 (1988)]。

以上の結果は、ヒトへの臨床応用に用いる抗体としては、ヒト化抗体の方がマウス抗体等のヒト以外の動物の抗体より望ましいことを明確に示している。

更に、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体[サイエンス(Science), 242, 423 (1988)]、ジスルフィド安定化V領域断片[モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 32, 249 (1995)]等の、より分子量の小さい抗体の断片の作製が可能となっている。これらの断片は、完全な抗体分子に比べ分子量が小さいため、標的組織への移行性に優れている[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 52, 3402 (1992)]。これらの断片についても、ヒトへの臨床応用の場合には、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体よりもヒト化抗体に由来する方がより望ましいと考えられる。

シアル酸を含有する糖脂質の一種であるガングリオシドは動物の細胞膜を構成しており、親水性側鎖である糖鎖と、疎水性側鎖であるスフィンゴシンおよび脂肪酸とから構成される分子である。ガングリオシドの種類と発現量は、細胞種、臓器種、動物種等によって異なることが知られている。更に細胞が癌化する過程においては、ガングリオシドの発現が量的および質的に変化を起こすことも知られている[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 45, 2405 (1985)]。特に、本発明で注目したGD3は、正常細胞にはごく微量にしか存在しないが、メラノーマ、ザルコーマ、グリオーマ、ニューロブラストーマ等の癌細胞では多量に存在し[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A., 77, 6114 (1980); ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.), 155, 1133 (1982); キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 45, 4401 (1985)]、GD3に対する抗体(以下、抗GD3抗体と表記する)は、これらの癌の治療に有用であると考えられている[メラノーマ・リサーチ(Melanoma Research), 7, S155 (1997)]。既に抗GD3マウス抗体であるR24では、メラノーマ患者への投与試験が行われたが、一部の患者で臨床効果は認められたものの、HAMAの誘導により抗体の血中からの消失が極めて速く、期待された程の効果には至っていない[メラノーマ・リサーチ(Melanoma Research), 7, S155 (1997)]。こうした観点から本発明者らは抗GD3抗体のより効果的なヒトへの臨床応用を目的として、本発明者らが作製した抗GD3マウス抗体KM641を基に、マウス

抗体と同等の活性を有する抗GD3キメラ抗体の作製を試み、抗GD3キメラ抗体KM871の作製に成功した(特開平5-304989)。抗GD3キメラ抗体KM871は、抗GD3マウス抗体に比べヒトでの免疫原性が低下し、血中半減期が延長し、より強い抗腫瘍効果が期待されている。しかし、他の抗GD3キメラ抗体のヒトでの臨床試験の結果、抗GD3キメラ抗体の中のマウス抗体に由来するV領域に対するヒト抗体が誘導され、アレルギー反応が惹起されることがあることが明らかとなった[キャンサー・ジャーナル・フロム・サイエンティフィック・アメリカン(Cancer J. From Scientific American), 3, S121 (1997)]。本発明者らが作製した抗GD3キメラ抗体KM871において同様の反応が惹起されるか否かは、ヒトでの臨床試験結果を待たねばならない。その様な問題が生じる可能性をできるだけ低くするためには、ヒトにおいて抗GD3キメラ抗体よりも更に免疫原性が低いと考えられるGD3に対するヒト型CDR移植抗体(以下、抗GD3CDR移植抗体と表記する)の作製が望まれる。しかし、これまでに抗GD3CDR移植抗体の作製の報告はない。

抗体断片に関しては、抗GD2マウス抗体由来の一本鎖抗体は作製されている[ハイブリドーマ(Hybridoma), 16, 335 (1997)]が、それ以外の抗体断片の作製の報告はなく、抗GD3抗体由来の抗体断片に関してはマウス抗体およびヒト化抗体に由来する抗体断片の作製の報告はない。従って、GD3に対するヒト化抗体(以下、抗GD3ヒト化抗体と表記する)に由来する抗体断片が作製できれば、ヒトにおいて優れた標的組織移行性を有し、かつ、免疫原性が低下することが期待される。

これまで述べてきた様に、ヒト化抗体および該抗体断片は、単独の使用によっても診断および治療の効果が期待されるが、更に他の分子との併用により、その効果をより高めることが検討されている。例えば、それら分子の一つとしてサイトカインが用いられている。サイトカインは免疫反応における細胞間相互作用を司る種々の液性因子の総称である。抗体の細胞障害活性には、CDC活性やADCC活性等が知られているが、ADCC活性は、単核球、マクロファージ、NK細胞などのFc受容体を細胞表面に有するエフェクター細胞によって担われている[ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 138, 1992 (1987)]。種々のサイトカインはこれらのエフェクター細胞を活性化することから、抗体のADCC活性等を高める目的で、抗体と組み合わせて投与することが行われている。例えば、抗GD2マウス抗体14.G2aおよび抗GD2キメラ抗体ch14.18に関しては、サイトカインであるヒトイ

ンターロイキン2 (以下、hIL-2と表記する) 或いはヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (以下、hGM-CSFと表記する) と併用してヒトに投与することが行われた[キャンサー(Cancer), 80, 317 (1997); キャンサー・ジャーナル・フロム・サイエンティフィック・アメリカン(Cancer J. From Scientific American), 3, S121 (1997)]。抗GD3マウス抗体R24に関しても、各種サイトカインとの併用療法が行われた[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 50, 7490 (1990), プロシーディングス・オブ・ザ・アメリカン・ソサエティ・オブ・クリニカル・オンコロジー(Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.), 1186, 345 (1992), ジャーナル・オブ・バイオロジカル・レスポンス・モディファイヤーズ(J. Biol. Response Mod.), 9, 319 (1990), プロシーディングス・オブ・ザ・アメリカン・ソサエティ・オブ・クリニカル・オンコロジー(Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.), 1182, 344 (1992), プロシーディングス・オブ・ザ・アメリカン・ソサエティ・オブ・クリニカル・オンコロジー(Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.), 1188, 346 (1992)]。しかし、これらの併用療法は、マウス抗体の抗原性或いはサイトカインの副作用から期待された程の効果は認められていない。そこで、抗体およびその抗体断片に放射性同位元素、蛋白質 (サイトカイン、トキシン、酵素等)、低分子の薬剤等を化学的に、或いは、遺伝子工学的に融合させた誘導体の作製が行われ、それらの臨床応用が検討されている[ザ・ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New Eng. J. Med.), 329, 459 (1993), アンチキャンサー・リサーチ(Anticancer Res.), 17, 1735 (1997), ブラッド(Blood), 78, 1173 (1991), ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー(J. Clin. Oncol.), 15, 723 (1997), バイオコンジュゲート・ケミストリー(Bioconjugate Chem.), 7, 606 (1997), キャンサー(Cancer), 61, 881 (1988), ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・キャンサー・リサーチ(Jpn. J. Cancer Res.), 85, 167 (1994), アンチボディ・イムノコンジュゲーツ・アンド・ラジオファーマシューティカルズ(Antibody Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals), 3, 60 (1990), サージェリー(Surgery), 106, 533 (1989)]。これらの誘導体は、抗体の結合特異性に従って放射性同位元素、蛋白質 (サイトカイン、トキシン、酵素等)、低分子の薬剤等を標的組織周辺に集積させることで、より効果的で副作用の少ない診断、治療を可能にすることが期待されている。例えば、上記に述べた併用療法に用いられたサイトカインの中で、ある程度

の抗腫瘍効果を示したhIL-2に関しては、抗GD2キメラ抗体ch14.18との融合蛋白質が遺伝子工学的に作製され、マウスを用いた実験でその抗腫瘍効果が抗GD2キメラ抗体ch14.18およびhIL-2の同時投与よりも優れていることが報告されている [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 89, 1428 (1992), プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 91, 9626 (1994), キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 42, 88 (1996), ブラッド(Blood), 91, 1706 (1998)]。しかし、抗GD3抗体に関しては、蛋白質(サイトカイン、トキシン、酵素等)、放射性同位元素、低分子の薬剤等を融合させた誘導体の作製の報告はない。従って、本発明の抗GD3ヒト化抗体および該抗体断片についても各種サイトカインとの融合蛋白質を始めとする、放射性同位元素、蛋白質(トキシン、酵素等)、低分子の薬剤等を融合させた誘導体があれば、ヒト体内に投与した時に免疫原性が低下し、副作用が少なく、更には腫瘍局所におけるより強力な抗腫瘍効果が期待される。

発明の開示

本発明では、抗GD3マウス抗体KM641のH鎖およびL鎖V領域のアミノ酸配列(特開平5-304989)から各CDRのアミノ酸配列を同定し、該CDRのアミノ酸配列とヒト抗体のH鎖およびL鎖V領域のフレームワーク領域(以下、FRと表記する)のアミノ酸配列から成るH鎖およびL鎖V領域をコードするcDNAをヒト抗体H鎖およびL鎖C領域をコードするcDNAを有する動物細胞用発現ベクターにクローニングして抗GD3CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより抗GD3CDR移植抗体KM8871を培養上清中に生産する形質転換株KM8871(FERM BP-6790)を作製した。更に、形質転換株KM8871の培養上清より抗GD3CDR移植抗体KM8871を精製し、抗GD3CDR移植抗体KM8871が抗GD3キメラ抗体KM871と同等の抗原結合活性、抗原結合特異性およびヒト癌細胞株に対する強い細胞障害活性を示すことを見出した。

さらに、抗GD3抗体、特に抗GD3CDR移植抗体KM8871のH鎖をコードするcDNAの3'末端にhIL-2をコードするcDNAを連結させてcDNAを構築し、該cDNAおよびKM8871のL鎖をコードするcDNAを動物細胞用発現ベクターにクローニングして抗GD3CDR移植抗体KM8871とhIL-2との融合蛋白質(以下、KM8871-hIL-2と表記する)の発

現ベクターを構築した。該KM8871-hIL-2発現ベクターを動物細胞へ導入することによりKM8871-hIL-2を培養上清中に生産する形質転換株KM8871hIL2 (FERM BP-6790) を作製した。更に、形質転換株KM8871hIL2の培養上清よりKM8871-hIL-2を精製し、KM8871-hIL-2が抗GD3CDR移植抗体KM8871と同等の抗原結合活性、抗原結合特異性およびhIL-2依存性増殖を示す細胞株に対してhIL-2と同等の増殖支持活性を示すことを見出した。更にはヒト末梢血単核球画分を用いた細胞障害活性において抗GD3CDR移植抗体KM8871に比べ、KM8871-hIL-2の活性が増強されることを確認し、本発明を完成させた。

本発明は、以下の(1)～(66)に関する。

(1) ガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。

(2) ガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる抗体である、上記(1)記載の抗体の誘導体。

(3) モノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む上記(1)または(2)記載の抗体の誘導体。

(4) モノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む上記(1)または(2)記載の抗体の誘導体。

(5) モノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、軽鎖(L鎖)V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む上記(1)または(2)記載の抗体の誘導体。

(6) ハイブリドーマが産生する抗体がKM641 (FERM BP-3116) である、上記(2)記載の抗体の誘導体。

(7) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である、上記(2)記載の抗体の誘導体。

(8) ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産

生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含む、上記（7）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

（9） ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域（C領域）およびL鎖C領域とからなる、上記（7）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

（10） H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含む、上記（8）または（9）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

（11） L鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む、上記（8）または（9）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

（12） H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む上記（8）または（9）記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

（13） H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む上記（8）または（9）記載のヒト型キメラ抗体KM871の誘導体。

（14） ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを含む、上記（7）記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

（15） ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域（FR）を含む、上記（7）記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

（16） ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域とからなるヒト型CDR移植抗体である上記（7）記載の抗体の誘導体。

（17） 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、上記（14）～（16）のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

（18） 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7お

よび8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(19) 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(20) 抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(21) 抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(22) 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

(23) 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む上記(14)～(16)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8871の誘導体。

(24) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である上記(1)記載の抗体断片の誘導体。

(25) 抗体断片が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、上記(1)または(24)記載の抗体断片の誘導体。

(26) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含む、上記(1)または(24)記載の抗体断片の誘導体。

(27) 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む、上記(1)または(24)記載の抗体断片の誘導体。

(28) 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号55、抗体のL鎖V領域が配列番号56で示されるアミノ酸配列を含む、上記(1)または(24)記載の抗体断片の誘導体。

(29) 抗体断片が、ガングリオシドGD3に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V

領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２４）記載の抗体断片の誘導体。

（３０） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２４）記載の抗体断片の誘導体。

（３１） 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２４）記載の抗体断片の誘導体。

（３２） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号9、抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２４）記載の抗体断片の誘導体。

（３３） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２４）記載の抗体断片の誘導体。

（３４） 抗体断片が、抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２４）記載の抗体断片の誘導体。

（３５） 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記（１）または（２４）記載の抗体断片の誘導体。

（３６） 蛋白質がサイトカインである、上記（１）～（３５）のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片の誘導体。

（３７） サイトカインがヒトインターロイキン2（hIL-2）である上記（３６）に記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片の誘導体。

（３８） 抗体の誘導体が、ヒト型キメラ抗体KM871とhIL-2とからなる上記（３７）記載の抗体の誘導体。

（３９） hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号57記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号56記載のアミノ酸配列を有する上記（３８）記載の抗体の誘導体。

（４０） 抗体の誘導体が、ヒト型CDR移植抗体KM8871とhIL-2とからなる上記（３７）記載の抗体の誘導体。

(41) hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号53記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号54記載のアミノ酸配列を有する上記(1)記載の抗体の誘導体。

(42) 上記(1)～(41)のいずれか1項に記載のガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体をコードするDNA。

(43) 上記(42)記載のDNAを含有する組換えベクター。

(44) 上記(43)記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(45) 上記(38)記載の抗体を生産する形質転換株KM871hIL2 (FERM BP-6918)。

(46) 上記(40)記載の抗体を生産する形質転換株KM8871hIL2 (FERM BP-6791)。

(47) 上記(44)～(46)記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に上記(1)～(41)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

(48) ガングリオシドGD3に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(49) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを含む、上記(48)記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(50) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFRを含む、上記(48)記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(51) ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域とからなる上記(48)記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(52) 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4

および5で示されるアミノ酸配列を含む、上記(49)～(51)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(53) 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(49)～(51)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(54) 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、上記(49)～(51)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(55) 抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む、上記(49)～(51)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(56) 抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、上記(49)～(51)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(57) 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、上記(49)～(51)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(58) 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、上記(49)～(51)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8871またはその抗体断片。

(59) 上記(48)～(58)のいずれか1項に記載のガングリオシドGD3に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片をコードするDNA。

(60) 上記(59)記載のDNAを含有する組換えベクター。

(61) 上記(60)記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(62) 上記(58)記載のヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換株KM8871 (FERM BP-6790)。

(63) 上記(61)または(62)記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に上記(48)～(58)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体また

はその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体またはその抗体断片を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

(64) 上記(1)～(41)記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに上記(48)～(58)記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種からなる医薬。

(65) 上記(1)～(41)記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに上記(48)～(58)記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する癌の治療薬。

(66) 上記(1)～(41)記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに上記(48)～(58)記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する癌の診断薬。

本発明はGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体に関する。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などがあげられる。

ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウスなどに由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体H鎖V領域（以下、HVまたはVHと表記する）および抗体L鎖V領域（以下、LVまたはVLと表記する）とヒト抗体のH鎖C領域（以下、CHと表記する）およびヒト抗体のL鎖C領域（以下、CLと表記する）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体は、GD3に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CH

およびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

抗GD3キメラ抗体の具体例としては、特開平5-304989に記載のKM871があげられる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明の抗CD3CDR移植抗体は、GD3に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列に移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することによりヒト型CDR移植抗体を発現させ、製造することができる。

本発明のヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、該ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

抗GD3CDR移植抗体の具体例としては、抗体のVHが配列番号9記載のアミノ酸配列、CHがヒト抗体IgG1サブクラスのアミノ酸配列から成り、抗体のVLが配列番号54記載のアミノ酸配列、CLがヒト抗体 κ クラスのアミノ酸配列から成る抗体KM8871があげられる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体

等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFv等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFabは、GD3に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

F(ab')₂は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有す

る抗体断片である。

本発明の $F(ab')_2$ は、GD3に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab'は、上記 $F(ab')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFab'は、GD3に特異的に反応する $F(ab')_2$ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することによりFab'を発現させ、製造することができる。

scFvは、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと表記する）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLは、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のscFvは、GD3に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することによりscFvを発現させ、製造することができる。

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法[プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 697 (1994)]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のdsFvに含まれるVHおよびVLはハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のdsFvは、GD3に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFvを製造することができる。

CDRを含むペプチドは、H鎖またはL鎖CDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、GD3に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得した後、該cDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体の誘導体は、上述したGD3に特異的に反応する抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖のN末端側或いはC末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを化学的手法〔抗体工学入門（金光修著 1994年（株）地人書館）〕により結合させることにより製造することができる。

または、GD3に特異的に反応する抗体または抗体断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入する。以上のような遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 等があげられ、例えば、クロラミンT法等により、抗体に結合させることができる。

低分子の薬剤としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタソンなどのホルモン剤等の抗癌剤〔臨床腫瘍学（日本臨床腫瘍研究会編 1996年 癌と化学療法社）〕、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マ

イン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法 昭和57年 医歯薬出版株式会社〕などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、hIL-2、hGM-CSF、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（以下、hM-CSFと表記する）、ヒトインターロイキン12（以下、hIL-12と表記する）等があげられる。また、癌細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体または抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

抗GD3ヒト化抗体とサイトカインとの融合蛋白質の具体例としては、抗GD3CDR移植抗体KM8871とhIL-2との融合蛋白質、抗GD3キメラ抗体KM871とhIL-2との融合蛋白質があげられる。抗GD3CDR移植抗体KM8871とhIL-2との融合蛋白質としては、hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号53記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号54記載のアミノ酸配列、L鎖C領域がヒト抗体 κ クラスのアミノ酸配列を有するKM8871-hIL-2があげられる。抗GD3キメラ抗体KM871とhIL-2との融合蛋白質としては、hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号57記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号56記載のアミノ酸配列、L鎖C領域がヒト抗体 κ クラスのアミノ酸配列を有するKM871-hIL-2があげられる。

以下に、GD3に特異的に反応するヒト化抗体およびGD3に特異的に反応する抗体または抗体断片の誘導体の作製方法について説明する。

1. ヒト化抗体の作製

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗

体のCHおよびCLをコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLであることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC γ 1と表記する）およびヒト抗体のL鎖の κ クラスのC領域（以下、hC κ と表記する）等があげられる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274[ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTRプロモーターとエンハンサー[バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター[セル(Cell), 41, 479 (1985)]とエンハンサー[セル(Cell), 33, 717 (1983)]等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプ或いは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい[ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93(W097/10354)、pEE18[ハイブリドーマ(HYBRIDOMA), 17, 559 (1998)]等があげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植

抗体の動物細胞での発現に使用することができる。

(2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下の様にして取得することができる。

マウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドおよびVLをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジンートリフルオロ酢酸セシウム法[メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法[モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989、以下、モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアルと表記する]等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

cDNAの合成およびcDNAライブラリー作製法としては、常法[モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34、以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと表記する]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) やZAP-cDNA

Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法等があげられる。

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+)[ヌクレイック・アシックス・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λzap II (Stratagene社製)、λgt10、λgt11[DNA クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach), 1, 49, (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2[モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)]およびpUC18[ジーン(Gene), 33, 103 (1985)]等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、C600[ジェネティックス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090[サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、NM522[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)]およびJM105[ジーン(Gene), 38, 275 (1985)]等が用いられる。

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル)により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction(以下、PCR法と表記する; モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー)によりVHおよびVLをコードするcDNAを調製することもできる。

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基

配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger, F.) らのジデオキシ法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 74, 5463 (1977)]等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNAシーケンサー (Pharmacia社製) 等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列からVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991、以下、シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレストと表記する]と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

(3) ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VHおよびVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)と比較することによって見出すことができる。

(4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体VHおよびVLの3'末端側の塩基配列とヒト抗体のCHおよびCLの5'末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

(5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは、以下の様にして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性(少なくとも60%以上)を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

(6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以

外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている[バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLでは、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与している。したがって、ヒト抗体のFR移植によりそれらアミノ酸残基が、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの異なるアミノ酸残基へと変化するため、抗原結合活性に影響を及ぼすと考えられている。この問題を解決するため、ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基などを同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体のアミノ酸残基に置換し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている[バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。ヒト型CDR移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 112, 535, (1977)]或いはコンピューターモデリング[プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 1501 (1994)]等による抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸残基の置換は、改変用合成DNAを用いて本項1の(5)に記載のPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的のアミノ酸残基の置換が施されたことを確認する。

(7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流に、本項1の(5)および(6)で構築したヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

例えば、本項1の(5)および(6)でヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

(8) ヒト化抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、本項1の(4)および(7)に記載のヒト化抗体発現ベクター、或いはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS-7細胞(ATCC CRL1651)が一般に用いられる[メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Methods in Nucleic Acids Res.), CRC press, 283 (1991)]。COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法[メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Methods in Nucleic Acids Res.), CRC press, 283 (1991)]、リポフェクション法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 84, 7413 (1987)]等があげられる。

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法[以下、ELISA法と表記する; アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、以下、アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアルと表記する、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996、以下、モノクローナル・アンティボディズ(1996)と表記する]等により測定できる。

(9) ヒト化抗体の安定発現

本項1の(4)および(7)に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に発現する形質転換株を得ることがで

きる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞 (ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、dhfrと表記する) が欠損したCHO細胞 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 77, 4216 (1980)]、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞 (ATCC CRL1662、以下、YB2/0細胞と表記する) 等があげられる。YB2/0細胞で発現させたヒト化抗体はADCC活性が高まるので好ましい。

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に発現する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate (以下、G418と表記する: SIGMA社製) 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地 (日水製薬社製)、GIT培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302培地 (JRH社製)、IMDM培地 (GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地 (GIBCO BRL社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (以下、FBSと表記する) 等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性はELISA法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、dhfr増幅系等を利用してヒト化抗体の発現量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる [アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル、モノクローナル・アンティボディズ(1996)]。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電

気泳動[以下、SDS-PAGEと表記する：ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)]やウエスタンブロッティング法[アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル、モノクローナル・アンティボディズ(1996)]等で測定することができる。

(10) ヒト化抗体の活性評価

精製したヒト化抗体の抗原との結合活性、培養癌細胞株に対する結合活性はELISA法および蛍光抗体法[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]等により測定できる。抗原陽性培養癌細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定し、評価することができる[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

(11) ヒト化抗体の使用法

ヒト化抗体は、ヒト由来の培養癌細胞株に発現しているGD3と特異的に結合し、かつCDC活性およびADCC活性等の細胞障害活性を示すため、肺癌、メラノーマ、グリオーマ、ニューロblastoma等のヒト癌等の診断および治療において有用であると考えられる。また、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において強い抗腫瘍効果を示し、かつ免疫原性を示さず、その治療効果が長期間に渡り持続することが期待される。

本発明のヒト化抗体は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ~ 8mg/kg である。

2. 抗体または該抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の作製

(1) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子の構築

サイトカインをコードする遺伝子を適当な合成DNAを介して、抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖をコードする遺伝子の5'末端或いは3'末端に連結することにより、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子を構築することができる。また、サイトカインをコードする遺伝子をPCR法で増幅する

際に、増幅用プライマーの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入し、抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖をコードする遺伝子の5'末端或いは3'末端に連結することにより、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子を構築することができる。サイトカインをコードする遺伝子は、染色体DNA、cDNAのいずれも用いることができる。構築した抗体または抗体断片とサイトカインの融合蛋白質をコードする遺伝子については、本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の配列であることを確認する。

(2) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の発現ベクターの構築

本項1の(4)および(7)に記載のヒト化抗体発現ベクター上の抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖をコードする遺伝子の一部またはすべてを、本項2の(1)に記載の抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子と置換することによって、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の発現ベクターを構築することができる。例えば、抗体のH鎖のC末端にサイトカインが融合した融合蛋白質を作製する場合は、本項2の(1)において、抗体または抗体断片のCHをコードする遺伝子の3'末端にサイトカインをコードする遺伝子を連結して抗体または抗体断片のCHとサイトカインとの融合蛋白質をコードする遺伝子を構築し、該遺伝子と本項1の(4)および(7)に記載のヒト化抗体発現ベクター上の抗体または抗体断片のCHをコードする遺伝子を置換することにより、発現ベクターを構築することができる。

(3) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の安定発現

本項2の(2)に記載の抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の発現ベクターを用いて本項1の(9)に記載した方法に従い、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の安定発現を行うことにより、抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質を安定に発現する形質転換株を得、その培養上清から抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質を精製し、その分子量等を解析することができる。

(4) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の in vitro 活性評価
精製した抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の活性のうち、抗体部分の活性、すなわち抗原との結合活性、培養癌細胞株に対する結合活性はELISA

法および蛍光抗体法等により測定できる。また、抗原陽性培養癌細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定し、評価することができる。一方、サイトカイン部分の活性は、例えば、該サイトカインに対して濃度依存的な増殖を示す培養細胞株の増殖支持活性を指標に評価することができる[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 91, 9626 (1994)]。

(5) 抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質のin vivo活性評価

抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の抗腫瘍効果は、抗原を発現している培養マウス癌細胞株を正常な免疫系を有する野生型マウスへ移植した同系移植マウスモデルに投与することにより評価することができる。また、該同系移植マウスモデルへの抗体単独、サイトカイン単独又は抗体とサイトカインの同時投与のそれぞれの場合を比較することにより、生体内における抗腫瘍効果を評価することができる[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 93, 7826 (1996)]。現在までにヒトメラノーマやニューロblastomaに特異的に発現するGD2又はGD3陽性のマウス培養細胞株の報告はない。しかしGD2又はGD3の生合成前駆体であるGM2又はGM3を発現するマウス培養細胞株に、特異的に発現させたいガングリオシドの合成酵素遺伝子を導入することにより、GD2又はGD3陽性の形質転換株を作製することができる[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 91, 10455 (1994)]。該形質転換株を正常な免疫系を有する野生型マウスへ移植することにより、同系移植マウスモデルを作製することができる。

以上のようにして作製したマウスモデルは、目的のガングリオシドに対する抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質のin vivo評価に用いることができる。

(6) ヒト化抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質の使用法

本発明の抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質は、ヒト由来の培養癌細胞株に発現しているGD3と特異的に結合し、かつCDC活性およびADCC活性等の細胞障害活性を示すため、肺癌、メラノーマ、グリオーマ、ニューロblastoma等のヒト癌等の診断、治療において有用であると考えられる。本発明のヒト

化抗体または抗体断片は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において強い抗腫瘍効果を示し、かつ免疫原性を示さず、その治療効果が長期間に渡り持続することが期待され、更に、融合させたサイトカイン部分の活性により癌の近傍で免疫担当細胞を活性化できることから、抗体単独、サイトカイン単独或いは抗体とサイトカインの同時投与等に比べ、より強い抗腫瘍効果が期待され、また、サイトカインの全身投与に比べ、副作用の低減が期待される。

本発明のヒト化抗体または抗体断片とサイトカインとの融合蛋白質は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、蛋白質製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該融合蛋白質そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該融合蛋白質を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該融合蛋白質および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $8\text{mg}/\text{kg}$ である。

図面の簡単な説明

図1はプラスミドphKM641Hの造成工程を示した図である。

図2はプラスミドphKM641Lの造成工程を示した図である。

図3はプラスミドpT796H641Lの造成工程を示した図である。

図4はプラスミドpBS641Hの造成工程を示した図である。

図5はプラスミドpT641の造成工程を示した図である。

図6はプラスミドpT641HCDRの造成工程を示した図である。

図7はプラスミドpT641LCDRおよびpT641HLCDRの造成工程を示した図である。

図8はプラスミドpT641、pT641HCDR、pT641LCDR、pT641HLCDRを用いた抗GD3キメラ抗体および抗GD3CDR移植抗体の一過性発現による活性評価を示した図である。縦軸に発現ベクター名、横軸に抗GD3キメラ抗体の活性を100とした時の相対活性値(%)をそれぞれ示す。

図9はプラスミドphKM641Lm-69の造成工程を示した図である。

図10はプラスミドpT641HLCDRNL、pT641HLCDRm-1、pT641HLCDRm-4、pT641HLCDRm-6、pT641HLCDRm-7、pT641HLCDRm-8、pT641HLCDRm-9、pT641HLCDRm-69の造成工程を示した図である。

図11はプラスミドpT641、pT641HLCDR、pT641HLCDRNL、pT641HLCDRm-1、

pT641HLCDRm-4、pT641HLCDRm-6、pT641HLCDRm-7、pT641HLCDRm-8、pT641HLCDRm-9、pT641HLCDRm-69を用いた抗GD3キメラ抗体および抗GD3CDR移植抗体の一過性発現による活性評価を示した図である。縦軸に発現ベクター名、横軸に抗GD3キメラ抗体の活性を100とした時の相対活性値(%)をそれぞれ示す。

図12はプラスミドpKANTEX641HLCDR、pKANTEX641HLCDRm-9、pKANTEX641HLCDRm-69の造成工程を示した図である。

図13は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のSDS-PAGE(4~15%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がKM8869、3がKM8870、4がKM8871、5が低分子量マーカー、6がKM8869、7がKM8870、8がKM8871の泳動パターンをそれぞれ示す。

図14は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のGD3との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がKM871、●がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の活性をそれぞれ示す。

図15は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のGD3との結合活性をプレートに吸着させるGD3量を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸はプレートに吸着させたGD3量をそれぞれ示す。○がKM871、●がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の活性をそれぞれ示す。

図16は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の各種ガングリオシドとの反応性を示した図である。縦軸にガングリオシドの種類、横軸に結合活性をそれぞれ示す。AcGM2はN-アセチルGM2、GcGM2はN-グリコリルGM2、AcGM3はN-アセチルGM3、GcGM3はN-グリコリルGM3を示す。□がKM871、□がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の反応性をそれぞれ示す。

図17は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のヒトメラノーマ細胞株G-361およびSK-MEL-28との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。各図は下段より、コントロール、KM871、KM8869、KM8870、KM8871の反応性をそれぞれ示す。

図18は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、

KM8870、KM8871のヒトメラノーマ細胞株G-361およびSK-MEL-28に対するCDC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□がKM871、□がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の活性をそれぞれ示す。

図19は精製した抗GD3キメラ抗体KM871と精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のヒトメラノーマ細胞株G-361およびSK-MEL-28に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□がKM871、□がKM8869、□がKM8870、■がKM8871の活性をそれぞれ示す。

図20はプラスミドpBSA-Bの造成工程を示した図である。

図21はプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2の造成工程を示した図である。

図22はプラスミドpBShC γ 1-IL-2の造成工程を示した図である。

図23はプラスミドpKANTEX8871-hIL2の造成工程を示した図である。

図24は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2のSDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が低分子量マーカー、2がKM8871、3がKM8871-hIL-2、4が低分子量マーカー、5がKM8871、6がKM8871-hIL-2の泳動パターンをそれぞれ示す。

図25は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2のGD3との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がKM8871、●がKM8871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

図26は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2の各種ガングリオシドとの反応性を示した図である。縦軸にガングリオシドの種類、横軸に結合活性をそれぞれ示す。AcGM2はN-アセチルGM2、GcGM2はN-グリコリルGM2、AcGM3はN-アセチルGM3、GcGM3はN-グリコリルGM3を示す。□がKM8871、■がKM8871-hIL-2の反応性をそれぞれ示す。

図27は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2のヒトメラノーマ細胞株G-361との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。各図は上段より、KM8871、KM8871-hIL-2の反応性をそれぞれ示す。

図28はhIL-2と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2のhIL-2依存性細胞CTL-2に

対する増殖支持活性を各蛋白質の濃度を変化させて測定した図である。縦軸は増殖支持活性、横軸は蛋白質濃度をそれぞれ示す。○がhIL-2、●がKM8871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

図29は精製した抗GD3CDR移植抗体KM8871と精製した融合蛋白質KM8871-hIL-2によるヒトエフェクター細胞の活性化とそれに伴う細胞障害活性を測定した図である。縦軸は細胞障害活性、横軸は用いた蛋白質をそれぞれ示す。□がKM8871、■がKM8871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

図30はプラスミドpKANTEX871-hIL2の造成工程を示した図である。

図31は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2のSDS-PAGE(4~15%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。左側が還元条件、右側が非還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が低分子量マーカー、2がKM871、3がKM871-hIL-2、4が低分子量マーカー、5がKM871、6がKM871-hIL-2の泳動パターンをそれぞれ示す。

図32は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2のGD3との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●がKM871、□がKM871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

図33は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2の各種ガングリオシドとの反応性を示した図である。縦軸にガングリオシドの種類、横軸に結合活性をそれぞれ示す。AcGM2はN-アセチルGM2、GcGM2はN-グリコリルGM2、AcGM3はN-アセチルGM3、GcGM3はN-グリコリルGM3を示す。■がKM871、□がKM871-hIL-2の反応性をそれぞれ示す。

図34は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2のヒトメラノーマ細胞株G-361およびSK-MEL-28との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。各図は上段より、G361細胞に対するKM871の反応性、G361細胞に対するKM871-hIL-2の反応性、SK-MEL-28細胞に対するKM871の反応性、SK-MEL-28細胞に対するKM871-hIL-2の反応性をそれぞれ示す。

図35はhIL-2と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2のhIL-2依存性細胞CTLL-2に対する増殖支持活性を各蛋白質の濃度を変化させて測定した図である。縦軸は増殖支持活性、横軸は蛋白質濃度をそれぞれ示す。●がhIL-2、○がKM871-hIL-2の活

性をそれぞれ示す。

図36は抗GD3キメラ抗体KM871と精製した融合蛋白質KM871-hIL-2によるヒトエフェクター細胞の活性化とそれに伴う細胞障害活性を測定した図である。縦軸は細胞障害活性、横軸は用いた蛋白質をそれぞれ示す。■がKM871、□がKM871-hIL-2の活性をそれぞれ示す。

図37はプラスミドpKANTEXGD3の造成工程を示した図である。

図38は抗GD3キメラ抗体KM871のGD3合成酵素遺伝子導入B16細胞株B16・29-10、B16・8-3および親株のB16・F10細胞との反応性を示した図である。縦軸に細胞数、横軸に蛍光強度をそれぞれ示す。各図は上段より、B16・F10細胞、B16・29-10およびB16・8-3の反応性をそれぞれ示す。

図39はGD3陽性B16細胞株B16・29-10を移植したBL/6マウスに対する抗GD3キメラ抗体KM871およびKM871-hIL-2の抗転移効果を測定した図である。グラフの縦軸は肺表面の転移巣の数、バーは各群の平均値を示す。非投与はコントロールの抗体非投与群を表す。◇はコントロール、○はKM871-IL-2投与、●はKM871投与マウスの肺転移巣の数をそれぞれ表す。

図40はGD3陽性B16細胞株B16・8-3を移植したBL/6マウスに対する抗GD3キメラ抗体KM871およびKM871-hIL-2の抗転移効果を測定した図である。グラフの縦軸は肺表面の転移巣の数、バーは各群の平均値を示す。非投与はコントロールの抗体非投与群を表す。◇はコントロール、○はKM871-IL-2投与、●はKM871投与マウスの肺転移巣の数をそれぞれ表す。

図41はGD3陽性B16細胞株B16・29-10を移植したBL/6マウスに対する抗GD3キメラ抗体KM871とhIL-2の併用投与およびKM871-hIL-2投与による抗転移効果を測定した図である。グラフの縦軸は肺表面の転移巣の数、バーは各群の平均値を示す。非投与はコントロールの抗体非投与群を表す。◇はコントロール、○はKM871-IL-2投与、●はKM871とhIL-2の併用投与マウスの肺転移巣の数をそれぞれ表す。

図42はGD3陽性B16細胞株B16・29-10を皮下移植したBL/6マウスの固形腫瘍・初期モデルに対するKM871-hIL-2の増殖抑制効果を測定した図である。グラフの縦軸はコントロール群の腫瘍体積の平均値に対する各群の腫瘍体積の平均値の比を示し、横軸は薬剤の投与を開始した日より経過した日数を示す。点線はコントロール、□はKM871投与群、△はhIL-2投与群、○はKM871-IL-2投与群をそれぞれ

れ表す。

図 4 3 は GD3 陽性 B16 細胞株 B16・29-10 を皮内移植した BL/6 マウスの固形腫瘍・進行期モデルに対する KM871-hIL-2 の増殖抑制効果を測定した図である。グラフの縦軸はコントロール群の V/V_0 の値の平均値に対する各群の V/V_0 の値の平均値の比を示す。 V/V_0 は各マウスの投与開始日の腫瘍体積に対する各測定日の腫瘍体積の比を示す。横軸は薬剤の投与を開始した日より経過した日数を示す。点線はコントロール、△は hIL-2 投与群、□は KM871 50 μ g/日投与群、■は KM871 200 μ g/日投与群、○は KM871-IL-2 24 μ g/日投与群、●は KM871-IL-2 60 μ g/日投与群をそれぞれ表す。

図 4 4 は GD3 陽性 B16 細胞株 B16・29-10 を皮内移植した BL/6 マウスの固形腫瘍・進行期モデルに対する抗 GD3 キメラ抗体 KM871 と KM871-hIL-2 の併用投与による増殖抑制効果を測定した図である。グラフの縦軸はコントロール群の V/V_0 の値の平均値に対する各群の V/V_0 の値の平均値の比を示す。 V/V_0 は各マウスの投与開始日の腫瘍体積に対する各測定日の腫瘍体積の比を示す。横軸は薬剤の投与を開始した日より経過した日数を示す。点線はコントロール、△は hIL-2 投与群、■は KM871 投与群、○は KM871 と KM871-IL-2 15 μ g/日の併用投与群、●は KM871 と KM871-IL-2 60 μ g/日の併用投与群をそれぞれ表す。

図 4 5 は hIL-2 あるいは KM871-hIL-2 による BL/6 マウス脾臓細胞の活性化とそれに伴う細胞障害活性の上昇を測定した図である。縦軸は細胞障害活性、横軸は細胞障害活性測定時に用いた KM871 濃度をそれぞれ示す。黒色のバーは非投与コントロールマウスの脾臓細胞、白色のバーは hIL-2 を 5 回投与したマウスの脾臓細胞、灰色のバーは KM871-hIL-2 を 1 回投与したマウスの脾臓細胞、斜線のバーは KM871-hIL-2 を 5 回投与したマウスの脾臓細胞を用いた時の活性をそれぞれ示す。

図 4 6 は hIL-2 あるいは KM871-hIL-2 を投与した BL/6 マウス脾臓細胞中の、各細胞集団の細胞数の割合を蛍光抗体法で測定した図である。縦軸は各細胞集団の脾臓細胞中における割合、横軸は各細胞集団をそれぞれ示す。白色のバーは非投与コントロールマウスの脾臓細胞、灰色のバーは hIL-2 を 5 回投与したマウスの脾臓細胞、黒色のバーは KM871-hIL-2 を 5 回投与したマウスの脾臓細胞、斜線のバーは KM871-hIL-2 を 2 回投与したマウスの脾臓細胞中の各細胞集団の割合をそ

れぞれ示す。

図47はNK細胞、CD4陽性T細胞あるいはCD8陽性T細胞をそれぞれ除去したBL/6マウスにKM871-hIL-2を投与した時の脾臓細胞による細胞障害活性を測定した図である。縦軸は細胞障害活性を示す。白色のバーは除去処理をしないマウスの脾臓細胞、黒色のバーはNK細胞を除去したマウスの脾臓細胞、灰色のバーはCD4陽性T細胞を除去したマウスの脾臓細胞、斜線のバーはCD8陽性T細胞を除去したマウスの脾臓細胞の細胞障害活性をそれぞれ示す。

図48はNK細胞、CD4陽性T細胞あるいはCD8陽性T細胞をそれぞれ除去したマウスにGD3陽性B16細胞株B16・29-10を移植したBL/6マウスに対するKM871-hIL-2の抗転移効果を測定した図である。縦軸は転移巣の数を示す。○はコントロールのマウスの肺の転移巣の数、●はKM871-hIL-2投与マウスの肺の転移巣の数、横棒は各群の平均値、グラフ中の数値はKM871-hIL-2投与による転移阻害率をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例1. 抗GD3CDR移植抗体の作製

1. 抗GD3マウス抗体KM641のV領域のアミノ酸配列の解析

特開平5-304989に開示されている抗GD3マウス抗体KM641のVHの全アミノ酸配列を配列番号1に、VLの全アミノ酸配列を配列番号2に示す。両配列と既知の抗体のアミノ酸配列(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)および精製した抗GD3マウス抗体KM641のH鎖およびL鎖のN末端アミノ酸配列の解析結果との比較から、H鎖についてはアミノ酸配列の-19から-1番目が、L鎖についてはアミノ酸配列の-20から-1番目が分泌シグナル配列であることが確認された。配列番号55に分泌型VHの全アミノ酸配列を、配列番号56に分泌型VLの全アミノ酸配列を示す。また、VHのCDR1、2および3は配列番号3、4および5、VLのCDR1、2および3は配列番号6、7および8に示すアミノ酸配列であることが明らかとなった。

2. 抗体の各種ガングリオシドに対する結合活性の測定(ELISA法)

抗体の各種ガングリオシドに対する結合活性は以下の様にして測定した。

2nmolの各種ガングリオシドを10 μ gのジバルミトイルフォスファチジルコリン (SIGMA社製) と5 μ gのコレステロール (SIGMA社製) とを含む2mlのエタノール溶液に溶解した。該溶液の20 μ l (20pmol/ウェルとなる) または該溶液をエタノールで希釈した溶液の20 μ lを96ウェルのELISA用のプレート (Greiner社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%BSAを含むPBS (以下、1%BSA-PBSと表記する) を100 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト化抗体の各種希釈溶液を50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS (以下、Tween-PBSと表記する) で洗浄後、1%BSA-PBSで1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(γ)抗体溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories社製) を二次抗体溶液として、50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 μ l/mlで添加した溶液]を50 μ l/ウェルで加えて発色させ、415nmの吸光度 (以下、OD415と表記する) を測定した。

3. 抗GD3CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAの構築

(1) 抗GD3CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の設計

まず、抗GD3CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。実施例1の1項で同定した抗GD3マウス抗体KM641のVHのCDRのアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVHをそのアミノ酸配列の相同性から3種類のサブグループ (HSG I ~ III) に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している (シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)。それら共通配列は、ヒトにおいてより免疫原性が低下する可能性が考えられることから、それら共通配列を基に抗GD3CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列を設計することとした。より活性の高い抗GD3CDR移植抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体のVHの3種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、KM641のVHのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択することとした。第1表には、相同性の検索結果を示した。第1表に示した様に、

KM641のVHのFRのアミノ酸配列はサブグループIIIと最も高い相同性を有していた。

第 1 表

ヒト抗体のH鎖V領域の各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列とKM641のH鎖V領域のFRのアミノ酸配列との間の相同性

<u>HSGI</u>	<u>HSGII</u>	<u>HSGIII</u>
62.1%	56.3%	78.2%

以上の結果から、ヒト抗体のVHのサブグループIIIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗GD3マウス抗体KM641のVHのCDRのアミノ酸配列を移植し、抗GD3CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0を設計した。

次に、抗GD3CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。実施例1の1項で同定した抗GD3マウス抗体KM641のVLのCDRのアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性から4種類のサブグループ (HSG I ~ IV) に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)。そこでH鎖の場合と同様にして、ヒト抗体のVLの4種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、KM641のVLのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。第2表には、相同性の検索結果を示した。第2表に示した様に、KM641のVLのFRのアミノ酸配列はサブグループIと最も高い相同性を有していた。

第 2 表

ヒト抗体のL鎖V領域の各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列とKM641のL鎖V領域のFRのアミノ酸配列との間の相同性

<u>HSGI</u>	<u>HSGII</u>	<u>HSGIII</u>	<u>HSGIV</u>
76.2%	60.0%	62.5%	67.5%

以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗GD3マウス抗体KM641のVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、抗GD3CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV.0を設計した。

上記で設計した抗GD3CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0およびVLのアミノ酸

配列LV.0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗GD3マウス抗体KM641のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列である。一般に、ヒト型CDR移植抗体では、マウス抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは抗体の活性が低下してしまうことが多い。そこで、抗体の活性低下を回避するため、ヒト抗体とマウス抗体で異なるFRのアミノ酸残基のうち、抗体の活性に影響を与えると推定されるアミノ酸残基をCDRのアミノ酸配列とともに移植することが行われている。そこで、本実施例においても、活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を同定することを検討した。

まず、上記で設計した抗GD3CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0およびVLのアミノ酸配列LV.0よりなる抗体V領域（以下、HV0LV0と表記する）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標の作製にはソフトウェアAbM（Oxford Molecular社製）、三次元構造の表示にはソフトウェアPro-Explore（Oxford Molecular社製）を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗GD3マウス抗体KM641のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、HV0LV0のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列において、抗GD3マウス抗体KM641と異なっている複数のアミノ酸残基について順次、抗GD3マウス抗体KM641に相当する位置のアミノ酸残基へ置換したアミノ酸配列から成るHV0LV0改変体三次元構造モデルも構築した。抗GD3マウス抗体KM641、HV0LV0および改変体のV領域の三次元構造を比較した。その結果、HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で、抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基を選択した。選択されたHV0LV0のFRのアミノ酸残基をマウス抗体KM641に見られるアミノ酸残基へ置換した結果、配列番号9に示す抗GD3CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列hKM641Hおよび配列番号10に示す抗GD3CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列hKM641Lを設計した。hKM641Hにおいては、HV.0のFRのアミノ酸配列の中で、10番目のGly、11番目のLeu、20番目のLeu、28番目のThr、84番目のAsn、91番目のThr、95番目のTyr、97番目のAla、115番目のValをそれぞれ、抗GD3マウス抗体KM641のVHに相当する位置のアミノ酸残基であるAsp、Phe、Val、Ala、Arg、Ser、Phe、Thr、Leuに置換した。hKM641Lにおいては、LV.0のFRのアミノ酸配列の中で、49番目のTyr、65番目のSer、71番目のPheをそれぞれ、抗GD3マウス抗体KM641のVLに相当する位置のアミノ酸残基であるTyr、Ser、Pheに置

換した。

(2) 抗GD3CDR移植抗体のVHをコードするcDNAの構築

実施例1の3項(1)で設計した抗GD3CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列hKM641HをコードするcDNAをPCR法を用いて以下の様にして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に配列番号1に記載の抗GD3マウス抗体KM641のH鎖の分泌シグナル配列を繋げて完全な抗体アミノ酸配列とした。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。一つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した。決定した遺伝子コドンを選定して、完全な抗体V領域のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を設計し、更に5'末端と3'末端にPCR時の増幅用プライマーの結合塩基配列(ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む)を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から約100塩基ずつ計6本の塩基配列に分け(隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する様にする)、更に、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で自動DNA合成機(380A、Applied Biosystems社製)を用いて合成した。

実際には、配列番号11から配列番号16の6本の合成DNAを合成した。各DNAを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に50 μ lの10mMトリス-塩酸(pH8.3)、50mM塩化カリウム、1.5mM塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、200 μ M dNTPs、0.5 μ M M13 primer RV(宝酒造社製)、0.5 μ M M13 primer M4(宝酒造社製)および2単位のTaKaRa Taq DNA polymerase(宝酒造社製)よりなる緩衝液に加え、50 μ lの鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラー(PJ480、PERKIN ELMER社製)にセットし、94 $^{\circ}$ Cにて2分間、55 $^{\circ}$ Cにて2分間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを30サイクル行った。該反応液をQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて添付の使用説明書に従い、精製後、30 μ lの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液とし、更に10単位の制限酵素ApaI(宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI(宝

酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約0.44kbのApaI-NotI断片を約0.2 μ g回収した。

次に、プラスミドpBluescript SK(-) (Stratagene社製)の3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約2.95kbのApaI-NotI断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られた抗GD3CDR移植抗体のVHのPCR産物のApaI-NotI断片0.1 μ gとプラスミドpBluescript SK(-)のApaI-NotI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製)を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia社製)に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有する図1に示したプラスミドpKM641Hを得た。

(3) 抗GD3CDR移植抗体のVLをコードするcDNAの構築

実施例1の3項(1)で設計した抗GD3CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列hKM641LをコードするcDNAをVHと同様にPCR法を用いて以下の様にして構築した。但し、分泌シグナル配列としては、配列番号2に記載の抗GD3マウス抗体KM641のL鎖のアミノ酸配列を用いた。

まず、配列番号17から配列番号22の6本の合成DNAを自動DNA合成機 (380A、Applied Biosystems社製)を用いて合成した。合成した各DNAを最終濃度が0.1 μ Mとなる様に50 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH8.3)、50mM塩化カリウム、1.5mM塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、200 μ M dNTPs、0.5 μ M M13 primer RV (宝酒造社製)、0.5 μ M M13 primer M4 (宝酒造社製)および2単位のTaKaRa Taq DNA polymerase

(宝酒造社製) よりなる緩衝液に加え、50 μ l の鉍油で覆い、DNA サーマルサイクラー (PJ480、PERKIN ELMER 社製) にセットし、94°C にて2分間、55°C にて2分間、72°C にて2分間のサイクルを30サイクル行った。該反応液を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて添付の使用説明書に従い、精製後、30 μ l の50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT および 100 μ g/ml BSA から成る緩衝液とし、更に10単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 SphI (宝酒造社製) を加えて37°C で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.39kb の EcoRI-SphI 断片を約0.2 μ g 回収した。

次に、特開平10-257893に記載のプラスミド pBSL3 の3 μ g を10 μ l の50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT および 100 μ g/ml BSA から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 SphI (宝酒造社製) を加えて37°C で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い、約2.95kb の EcoRI-SphI 断片を約2 μ g 回収した。

次に、上記で得られた抗GD3CDR移植抗体のVLのPCR産物のEcoRI-SphI断片0.1 μ g とプラスミド pBSL3 のEcoRI-SphI断片0.1 μ g を全量20 μ l の滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia 社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia 社製) に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia 社製) により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有する図2に示したプラスミド phKM641L を得た。

4. 抗GD3CDR移植抗体の動物細胞を用いた一過性発現による活性評価

抗GD3CDR移植抗体の活性評価をより迅速に行なうために、COS-7細胞 (ATCC CRL1651) を用いて抗GD3CDR移植抗体の一過性発現を以下の様に行なった。

(1) 抗GD3キメラ抗体KM871の一過性発現ベクターpT641の構築

抗GD3CDR移植抗体の一過性発現による活性評価における陽性対照として用いるため、抗GD3キメラ抗体KM871の一過性発現ベクターpT641を以下の様にして構築し

た。

一般に、動物細胞を用いた一過性発現の効率は導入された発現ベクターのコピ数に依存していることから、より小さい発現ベクターの方が発現効率が高いことが考えられた。そこで特開平10-257893に記載の抗ガングリオシドGM2キメラ抗体KM966の一過性発現ベクターpT796と特開平5-304989に記載の抗GD3マウス抗体KM641のVHを有するプラスミドpKM641HF1および抗GD3マウス抗体KM641のVLを有するプラスミドpKM641LA2を用いて抗GD3キメラ抗体KM871の一過性発現ベクターpT641を以下の様にして構築した。

まず、特開平5-304989に記載の抗GD3マウス抗体KM641のVLを有するプラスミドpKM641LA2の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.35kbのHindIII-EcoRI断片を約0.2 μ g回収した。

次に、特開平10-257893に記載の抗ガングリオシドGM2キメラ抗体KM966の一過性発現ベクターpT796の3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 μ g/ml BSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素SplI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約9.20kbのEcoRI-SplI断片を約2 μ g回収した。

次に、配列番号23および配列番号24に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNAを自動DNA合成機 (380A、Applied Biosystems社製) を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 μ gずつを15 μ lの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 μ lの10倍緩衝液 (500mMトリス-塩酸 (pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT) と2 μ lの10mM ATPを加え、更に10単位のT4 Polynucleotide Kinase (宝酒造社製) を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端を

リン酸化した。

次に、上記で得られたプラスミドpKM641LA2由来のHindIII-EcoRI断片0.1 μ gとプラスミドpT796由来のEcoRI-SplI断片0.1 μ gとリン酸化合成DNA0.05 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図3に示したプラスミドpT796H641Lを得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia社製) に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia社製) により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

次に、プラスミドpBluescript SK(-) (Stratagene社製) の3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μ g/ml BSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素XbaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、30 μ lの30mM酢酸ナトリウム (pH5.0)、100mM塩化ナトリウム、1mM酢酸亜鉛および5%グリセロールから成る緩衝液に加え、更に30単位の修飾酵素Mung Bean Nuclease (宝酒造社製) を加えて25°Cで15分間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約2.95kbのBlunt end-ApaI断片を約2 μ g回収した。

次に、プラスミドpKM641HF1の3 μ gを10 μ lの50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、制限酵素消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel

Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.44kbのBlunt end-ApaI断片を約0.2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpBluescript SK(-)のBlunt end-ApaI断片0.1 μ gとプラスミドpKM641HF1のBlunt end-ApaI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図4に示したプラスミドpBS641Hを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpT796H641Lの3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約9.16kbのApaI-NotI断片を約0.2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpBS641Hの3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.44kbのApaI-NotI断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpT796H641L由来のApaI-NotI断片0.1 μ gとプラスミドpBS641H由来のApaI-NotI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図5に示したプラスミドpT641を得た。

(2) 抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターの構築

上記実施例1の4項(1)で得られた抗GD3キメラ抗体一過性発現ベクターpT641と実施例1の3項(2)および(3)で得られたプラスミドphKM641HおよびphKM641Lを用いて抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターを以下の様にして構築した。

まず、実施例1の3項(2)で得られたプラスミドphKM641Hの3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約0.44kbのApaI-NotI断片を約0.2 μ g回収した。

次に、実施例1の4項(1)で得られたプラスミドpT641の3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約9.16kbのApaI-NotI断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドphKM641H由来のApaI-NotI断片0.1 μ gとプラスミドpT641由来のApaI-NotI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製)を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図6に示したプラスミドpT641HCDRを得た。

次に、実施例1の3項(3)で得られたプラスミドphKM641Lの3 μ gを10 μ lの50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT および100 μ g/ml BSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒

造社製) および制限酵素SplI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.2 μ g回収した。

次に、実施例1の4項(1)で得られたプラスミドpT641および上記で得られたプラスミドpT641HCDRの3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 μ g/ml BSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素SplI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、それぞれのプラスミド由来の約9.20kbのEcoRI-SplI断片を約2 μ gずつ回収した。

次に、上記で得られたプラスミドphKM641L由来のEcoRI-SplI断片0.1 μ gとプラスミドpT641由来のEcoRI-SplI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。また、上記で得られたプラスミドphKM641L由来のEcoRI-SplI断片0.1 μ gとプラスミドpT641HCDR由来のEcoRI-SplI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。この様にして得られたそれぞれの組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図7に示したプラスミドpT641LCDRおよびpT641HLCDRを得た。

(3) 抗GD3キメラ抗体および抗GD3CDR移植抗体の動物細胞を用いた一過性発現による活性評価

上記実施例1の4項(1)および(2)で得られた抗GD3キメラ抗体の一過性発現ベクターpT641、抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターpT641HLCDRおよびマウス抗体とヒト型CDR移植抗体のV領域を有する抗GD3ハイブリッド抗体の一過性発現ベクターpT641HCDR、pT641LCDRを用いて抗体の一過性発現を以下の様にして行った。

COS-7細胞 (ATCC CRL1651) を 1×10^5 細胞/mlで6ウェルプレート (Falcon社製) に2mlずつ分注し、37°Cで一晩培養した。100 μ lのOPTI-MEM培地 (GIBCO BRL社製) に各発現ベクターの2 μ gを加え、更に100 μ lのOPTI-MEM培地に10 μ lのLIPOFECTAMINE Reagent (GIBCO BRL社製) を添加した溶液を加え、室温で40分間

反応させ、DNA-リボソームの複合体を形成させた。一晚培養したCOS-7細胞を2mlのOPTI-MEM培地（GIBCO BRL社製）で2回洗浄後、複合体を含む溶液に0.8mlのOPTI-MEM培地を添加した溶液を加え、37°Cで7時間培養後、溶液を除去し、2mlの10%FBSを含むDME培地（GIBCO BRL社製）を添加し、37°Cで培養した。各発現ベクターの導入後、72時間後に培養上清を回収し、必要に応じて濃縮操作を行ない、実施例1の2項に記載のELISA法により培養上清中の抗GD3ヒト化抗体のGD3(DIA-IATRON社製)に対する結合活性を、後述する本項(4)に示すELISA法により培養上清中の抗GD3ヒト化抗体の濃度を測定し、それらの値から活性を、陽性対照である抗GD3キメラ抗体の活性を100とした時の相対活性値(%)として算出した。その結果を図8に示した。図8に示した様に、一過性発現ベクターpT641HCDRに由来する抗GD3ハイブリッド抗体(VHがヒト型CDR移植抗体由来で、VLがキメラ抗体由来)は、一過性発現ベクターpT641に由来する抗GD3キメラ抗体とほぼ同等の結合活性を示したが、一方、一過性発現ベクターpT641LCDRに由来する抗GD3ハイブリッド抗体(VHがキメラ抗体由来で、VLがヒト型CDR移植抗体由来)は、抗GD3キメラ抗体に比べ約50%の結合活性を示した。更に、一過性発現ベクターpT641HLCDRに由来する抗GD3CDR移植抗体では、抗GD3キメラ抗体に比べ約5%の結合活性しか示さず、活性の著しい低下が認められた。

以上の結果から、実施例1の3項(1)で設計したVHおよびVLを有する抗GD3CDR移植抗体では、その結合活性が著しく低下してしまうこと、また、その活性低下の主な原因はVLにあると考えられるが、抗GD3キメラ抗体のVHとの組合せで約50%の活性が認められることから、特にVHとの相互作用部位に問題があることが示唆された。そこで、実施例1の3項(1)で設計したVLのアミノ酸残基の更なる改変による抗体の活性の上昇を検討した。

(4) ELISA法による一過性発現培養上清中のヒト化抗体の濃度の測定

ヤギ抗ヒトIgG(γ -chain)抗体(医学生物学研究所社製)をPBSで400倍希釈した溶液の50 μ lを96ウェルのELISA用のプレート(Greiner社製)の各ウェルに分注し、4°Cで一晩反応させた。抗体溶液を除去後、1%BSA-PBSを100 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、実施例1の4項(3)で得られた一過性発現培養上清或いは精製した抗GD3キメラ抗体KM871の各種希釈液を50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、

各ウェルをTween-PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト κ L鎖抗体（Zymed社製）をPBSで500倍希釈した溶液を50 μ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2' アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 μ l/mlで添加した溶液]を50 μ l/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

5. 抗GD3CDR移植抗体のVLのアミノ酸残基の改変による結合活性の上昇

実施例1の3項(1)で設計した抗GD3CDR移植抗体のVLのアミノ酸残基の改変による結合活性の上昇を以下の様にして行った。

(1) 抗GD3CDR移植抗体のVLのアミノ酸残基の改変および改変したVLをコードするcDNAの構築

まず、実施例1の3項(1)で構築した各種抗体のV領域の三次元構造のコンピューターモデルより、VHとVLの相互作用部位に位置するアミノ酸残基およびVLの各CDRの立体構造に影響を与えると考えられるアミノ酸残基で、かつ、ヒト型CDR移植抗体のVLにおいてマウス抗体のアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を同定した。その結果、配列番号10に示した抗GD3CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列であるhKM641Lの7番目のSer、8番目のPro、12番目のSer、41番目のGly、44番目のPro、72番目のThr、77番目のSer、83番目のPhe、87番目のTyrを同定した。これらのアミノ酸残基について、マウス抗体に見られるアミノ酸残基へ置換することにより、以下の8種類の改変体抗GD3CDR移植抗体のVLを設計した。即ち、hKM641NLにおいてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、8番目のProをAla、12番目のSerをPro、44番目のProをVal、87番目のTyrをPheに、hKM641Lm-1においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、7番目のSerをThr、8番目のProをAla、12番目のSerをProに、hKM641Lm-4においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、87番目のTyrをPheに、hKM641Lm-6においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、41番目のGlyをAsp、44番目のProをValに、hKM641Lm-7においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、72番目のThrをSer、77番目のSerをAsn、83番目のPheをIleに、hKM641Lm-8においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、77番目のSerをAsnに、hKM641Lm-9においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、83番目のPheをIle、87番目のTyrをPheに、hKM641Lm-69においてはhKM641Lアミノ酸配列のうち、41番目のGlyをAsp、44番目のProをVal、83番目のPheをIle、87番目のTyrをPhe

にそれぞれ置換した。これら改変したVLのうち、hKM641NLとhKM641Lm-69を除く6種類の改変したVLをコードするcDNAは、PCR法を用いた変異導入法により以下の様にして構築した。即ち、変異を導入する為のアンチセンス鎖およびセンス鎖のDNAプライマーを自動DNA合成機（380A、Applied Biosystems社製）を用いて合成し、プラスミドpKM641Lの1ngを鋳型として最終濃度0.5 μ MのM13 Primer RV（宝酒造社製）とアンチセンス鎖DNAプライマーおよびM13 Primer M4（宝酒造社製）とセンス鎖DNAプライマーを用いて第一PCRを実施例1の3項（2）に記載の方法に従って行った。該各反応液をQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、20 μ lの10mMトリス-塩酸（pH8.0）で溶出、精製した後、各溶出液の5 μ lを用いて第二PCRを実施例1の3項（2）に記載の方法に従って行った。該反応液をQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、精製後、30 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 μ g/ml BSAから成る緩衝液とし、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.2 μ g回収した。

次に、上記で得られた改変した抗GD3CDR移植抗体のVLのPCR産物のEcoRI-SplI断片0.1 μ gと実施例1の3項（3）で得られたプラスミドpBSL3のEcoRI-SplI断片0.1 μ gを全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（Pharmacia社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動して塩基配列を決定し、目的の改変が施されたcDNAを有するプラスミドを得た。

具体的には、アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号25の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号26の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号27に示した塩基配列を有するプラスミドpKM641Lm-1を得た。また、配列番号27には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-1を併記した。

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号28の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号29の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号30に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-4を得た。また、配列番号30には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-4を併記した。

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号31の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号32の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号33に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-6を得た。また、配列番号33には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-6を併記した。

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号34の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号35の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号36に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-7を得た。また、配列番号36には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-7を併記した。

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号37の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号38の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号39に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-8を得た。また、配列番号39には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-8を併記した。

アンチセンス鎖DNAプライマーとして配列番号40の合成DNA、センス鎖DNAプライマーとして配列番号41の合成DNAを用いて上記の一連の操作を行い、配列番号42に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641Lm-9を得た。また、配列番号42には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-9を併記した。

改変したVLのうち、hKM641NLをコードするcDNAは、配列番号17、22、43から46の6本の合成DNAを自動DNA合成機（380A、Applied Biosystems社製）を用いて合成し、それらを用いて実施例1の3項（3）に記載の操作を行うことにより、構築した。その結果、目的の改変が施された配列番号47に示した塩基配列を有するプラスミドphKM641NLを得た。また、配列番号47には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641NLを併記した。

改変したVLのうち、hKM641Lm-69をコードするcDNAは、上記で得られた改変したVLのcDNAを有するプラスミドphKM641Lm-6およびphKM641Lm-9を用いて以下の様にして構築した。

まず、プラスミドphKM641Lm-6の3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM

塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）およびPstI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約0.30kbのEcoRI-PstI断片を約0.3μg回収した。

次に、プラスミドphKM641Lm-9の3μgを10μlの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）およびPstI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約3.05kbのEcoRI-PstI断片を約2μg回収した。

次に、上記で得られたプラスミドphKM641Lm-6由来のEcoRI-PstI断片0.1μgとプラスミドphKM641Lm-9由来のEcoRI-PstI断片0.1μgを全量20μlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（Pharmacia社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図9に示したプラスミドphKM641Lm-69を得た。得られたプラスミドの10μgを用い、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的の改変が施された配列番号48に示した塩基配列を有することが確認された。また、配列番号48には、該塩基配列がコードするアミノ酸配列であるhKM641Lm-69を併記した。

（2）改変VLを有する抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターの構築

上記実施例1の5項（1）で得られた各種改変VLをコードするcDNAを有するプラスミドと実施例1の4項（2）で得られた抗GD3ハイブリッド抗体の一過性発現ベクターpT641HCDRを用いて各種改変VLを有する抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターを以下の様にして構築した。

まず、実施例1の5項（1）で得られた各プラスミドphKM641NL、phKM641Lm-1、phKM641Lm-4、phKM641Lm-6、phKM641Lm-7、phKM641Lm-8、phKM641Lm-9、phKM641Lm-69の各3μgを10μlの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100μg/ml BSAから成る緩衝液に加え、更に10単位

の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37℃で1時間反応させた。該各反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、それぞれ約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.2μg回収した。

次に、上記で得られた各種改変VLのEcoRI-SplI断片0.1μgと実施例1の4項（2）で得られた抗GD3ハイブリッド抗体の一過性発現ベクターpT641HCDR由来のEcoRI-SplI断片0.1μgを全量20μlの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase（Pharmacia社製）を用いて連結した。この様にして得られたそれぞれの組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図10に示した各種改変VLを有する抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターpT641HLCDRNL、pT641HLCDRLm-1、pT641HLCDRLm-4、pT641HLCDRLm-6、pT641HLCDRLm-7、pT641HLCDRLm-8、pT641HLCDRLm-9、pT641HLCDRLm-69を得た。

（3）改変VLを有する抗GD3CDR移植抗体の動物細胞を用いた一過性発現による活性評価

上記実施例1の4項（2）で得られた抗GD3キメラ抗体の一過性発現ベクターpT641、抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターpT641HLCDRおよび上記実施例1の5項（2）で得られた改変VLを有する抗GD3CDR移植抗体の一過性発現ベクターpT641HLCDRNL、pT641HLCDRLm-1、pT641HLCDRLm-4、pT641HLCDRLm-6、pT641HLCDRLm-7、pT641HLCDRLm-8、pT641HLCDRLm-9、pT641HLCDRLm-69を用いて各抗体の一過性発現および活性評価を実施例1の4項（3）に記載の方法に従い、行った。その結果を図11に示した。図11に示した様に、一過性発現ベクターpT641HLCDRLm-6、pT641HLCDRLm-7、pT641HLCDRLm-9、pT641HLCDRLm-69に由来する改変抗GD3CDR移植抗体では、改変前の抗GD3CDR移植抗体に比べ結合活性の上昇が認められ、特に一過性発現ベクターpT641HLCDRLm-69に由来する改変抗GD3CDR移植抗体では、その結合活性は抗GD3キメラ抗体の約80%を示した。一方、これら以外の一過性発現ベクターに由来する改変抗GD3CDR移植抗体では、改変前の抗GD3CDR移植抗体に比べ結合活性の上昇は認められなかった。以上の結果より、実施例1の5項（1）で同定したVLの改変アミノ酸残基のうち、41番目、44番目、83番目および87番目のアミノ酸残基が結合活性の上昇に大きく寄与することが判明した。また、41番目と44番目または83番目と87番目の2種類のアミノ酸残基を同時置換することは、活性

上昇に相乗的に寄与し、更に41番目、44番目、83番目および87番目の4種類のアミノ酸残基の同時改変も活性上昇に相乗的に寄与することが判明した。実施例1の3項(1)で構築した各種抗体のV領域の三次元構造のコンピューターモデルより、41番目と44番目のアミノ酸残基はVHとの相互作用に、83番目と87番目のアミノ酸残基はVLのCDR3の立体構造にそれぞれ影響を与えることが示唆され、これらのアミノ酸残基をマウス抗体に見られるアミノ酸残基に改変することで、抗体全体の立体構造が適切に保たれ、その結果、結合活性が上昇することが考えられた。本知見は、ヒト型CDR移植抗体の作製においてはVHとVLの相互作用部位をも考慮する必要があることを示しており、それら相互作用部位の同定には抗体V領域の立体構造からの情報を基にした種々の検討が必要であることを示している。そして、それら相互作用部位に関しては、個々の抗体により異なることは容易に類推され、現段階では一般的な法則を見出すことは困難であり、目的とする個々の抗体に応じた試行錯誤が必要である。

6. 抗GD3CDR移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

上記実施例1の5項(3)に記載の結果から、一過性発現ベクターpT641HLCDR_{Lm}-9、pT641HLCDR_{Lm}-69に由来する抗GD3CDR移植抗体は、抗GD3キメラ抗体に比べ、それぞれ約20%、約80%程度のGD3に対する結合活性を有することが示唆された。そこで、それら抗GD3CDR移植抗体の活性を更に詳細に評価するため、以下に示す方法に従い、抗GD3CDR移植抗体を安定に発現する形質転換細胞株を得、形質転換細胞株の培養上清より抗GD3CDR移植抗体の精製を行った。また、比較の為、一過性発現ベクターpT641HLCDRに由来する抗GD3CDR移植抗体の安定発現、精製も同様にして行った。

(1) 抗GD3CDR移植抗体の安定発現ベクターの構築

上記実施例1の5項(2)で構築した各種一過性発現ベクターに、以下の様な方法で薬剤G418に対する耐性遺伝子およびdhfr遺伝子を導入し、安定発現ベクターを構築した。

まず、W097/10354に記載のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の3 μ gを10 μ lの20mMトリス-塩酸(pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI(宝酒造社製)および制限酵素XhoI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガ

ロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約8.68kbのBamHI-XhoI断片を約1 μ g回収した。

次に、上記実施例1の5項(2)で構築した一過性発現ベクターpT641HLCDR_{Lm}-9、pT641HLCDR_{Lm}-69、pT641HLCDRの各3 μ gを10 μ lの20mMトリス-塩酸(pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI(宝酒造社製)、制限酵素XhoI(宝酒造社製)および制限酵素StuI(宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約4.90kbのBamHI-XhoI断片を約1 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX93由来のBamHI-XhoI断片0.1 μ gと各種一過性発現ベクター由来のBamHI-XhoI断片0.1 μ gをそれぞれ全量20 μ lの滅菌水に加え、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Pharmacia社製) を用いて連結した。この様にして得られた各組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図12に示した抗GD3CDR移植抗体の安定発現ベクターpKANTEX641HLCDR_{Lm}-9、pKANTEX641HLCDR_{Lm}-69、pKANTEX641HLCDRを得た。

(2) 抗GD3CDR移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

上記実施例1の6項(1)で得られた各種抗GD3CDR移植抗体の安定発現ベクターを用いて抗GD3CDR移植抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

各種抗GD3CDR移植抗体発現ベクターの4 μ gを4 $\times 10^6$ 細胞のラットミエローマ細胞株YB2/0細胞(ATCC CRL1662)ヘエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133, (1990)]により導入後、40mlのRPMI1640-FBS(10)[牛胎児血清(FBS)を10%含むRPMI1640培地]に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート(住友ベークライト社製)に200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37°C、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになる様に添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の各種抗GD3CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例1の2項に示すELISA法[二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(γ)抗体を使用]により測定した。

培養上清中に抗GD3CDR移植抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418を

0.5mg/ml、dhfr遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素（以下、DHFRと表記する）の阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTXと表記する：SIGMA社製）を50nM含むRPMI1640-FBS(10)培地に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/mlになる様に懸濁し、24ウェルプレート（Greiner社製）に2mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37°Cで1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の各種抗GD3CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例1の2項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗GD3CDR移植抗体が発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むRPMI1640-FBS(10)培地で増殖可能かつ、抗GD3CDR移植抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、2回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。安定発現ベクターpKANTEX641HLCDR_{Lm}-9、pKANTEX641HLCDR_{Lm}-69、pKANTEX641HLCDRを導入して得られたそれぞれの形質転換細胞クローンは、KM8870、KM8871、KM8869と命名し、それぞれの形質転換細胞クローンの抗GD3CDR移植抗体の発現量は約5 μ g/10⁶細胞/24hr、約10 μ g/10⁶細胞/24hr、約30 μ g/10⁶細胞/24hrであった。

（3）抗GD3CDR移植抗体の培養上清からの精製

上記実施例1の6項（2）で得られた各種抗GD3CDR移植抗体を発現する形質転換細胞クローンKM8870、KM8871、KM8869をG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むGIT培地（日本製薬社製）に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/mlとなる様に懸濁し、175cm²フラスコ（Greiner社製）に200mlずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37°Cで5~7日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A（Bioprocessing社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、各抗GD3CDR移植抗体を精製した。KM8870の培養上清500mlからは抗GD3CDR移植抗体KM8870を約3mg、KM8871の培養上清1600mlからは抗GD3CDR移植抗体KM8871を約25mg、KM8869の培養上清1000mlからは抗GD3CDR移植抗体KM8869を約65mg取得した。得られた各抗GD3CDR移植抗体の約4 μ gを、公知の方法[ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)]に従って電気泳動し、分子量および精製度を調べた。その結果を図13に示した。図13に示した様に、精製した各抗GD3CDR移植抗体は、非還元条件下では分子量は約150キログルトン（以下、Kdと表記する）であり、還元条件下

では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のH鎖およびL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量（H鎖：約49Kd、L鎖：約24Kd、分子全体：約146Kd）とほぼ一致し、更に、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合（以下、S-S結合と表記する）が切断され、約50Kdの分子量を持つH鎖と約25Kdの分子量を持つL鎖に分解されるという報告（アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス）と一致し、各抗GD3CDR移植抗体が正しい構造の抗体分子として発現されていることが確認された。また、精製した各抗GD3CDR移植抗体のH鎖およびL鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー（470A、Applied Biosystems社製）を用いて自動エドマン分解により解析した結果、それぞれのcDNAの塩基配列から推定されるH鎖およびL鎖のN末端アミノ酸配列と一致することを確認した。

7. 抗GD3CDR移植抗体の活性評価

（1）抗GD3CDR移植抗体のGD3に対する反応性（ELISA法）

精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のGD3（DIA-IATRON社製）に対する反応性を実施例1の2項に示すELISA法により測定した。図14は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるGD3の量を20pmol/ウェルに固定し、添加する抗GD3キメラ抗体KM871および抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の濃度を変化させて反応性を検討した結果である。図14に示した様に、抗GD3CDR移植抗体のうち、KM8871が最も高い結合活性を示し、それは抗GD3キメラ抗体KM871の約1/2であった。図15は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるGD3の量を変化させ、一定濃度（10 μ g/ml）の抗GD3キメラ抗体KM871および抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の反応性を検討した結果である。図15に示した様に、抗GD3CDR移植抗体のうち、KM8871が最も高い結合活性を示し、それは抗GD3キメラ抗体KM871と同等であった。図16は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるガングリオシドの種類を変えて（吸着量：20pmol/ウェル）、一定濃度（10 μ g/ml）の抗GD3キメラ抗体KM871および抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の反応性を検討した結果である。使用したガングリオシドは、GM1、N-アセチルGM2（Boehringer mannheim社製、以下、AcGM2と表記する）、N-グリコリルGM2（以下、GcGM2と表記する）、N-アセチルGM3（以下、AcGM3と表記する）、N-グリコリルGM3

(以下、GcGM3と表記する)、GD1a、GD1b (DIA-IATRON社製)、GD2、GD3 (DIA-IATRON社製)、GQ1b (DIA-IATRON社製)、GT1b (フナコシ社製) の11種類である。なお、GM1とGD1aはウシ脳より、N-グリコリルGM2とN-グリコリルGM3はマウス肝臓より、N-アセチルGM3はイヌ赤血球より、GD2はヒト神経芽細胞腫培養細胞株IMR32 (ATCC CCL127) より、それぞれ公知の方法[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 263, 10915 (1988)]に準じて精製した。図16に示した様に、抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871は、いずれも抗GD3キメラ抗体KM871と同様にGD3に対して強く、GQ1bに対して弱く結合し、その他のガングリオシドとは結合せず、キメラ抗体KM871の結合特異性を保持していることが示された。

(2) 抗GD3CDR移植抗体のヒト癌細胞との反応性 (蛍光抗体法)

精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のヒト癌細胞との反応性は、以下の様にして測定した。ヒトメラノーマ培養細胞株G-361 (ATCC CRL1424) およびSK-MEL-28 (ATCC HTB72) のそれぞれ 1×10^6 細胞をPBSに懸濁させ、マイクロチューブ (Treff社製) に取り、遠心分離 (2000rpm、2分間) して細胞を洗浄後、抗GD3キメラ抗体KM871または抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871を $50 \mu\text{l}$ (1%BSA-PBSで $5 \mu\text{g/ml}$ に調整した溶液) 加えて攪拌し、 4°C で1時間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、フルオレッセインイソシアネート (以下、FITCと表記する) で蛍光標識したウサギ抗ヒトIgG (H+L) F(ab')_2 溶液 (和光純薬工業社製、1%BSA-PBSで30倍希釈して使用) を $20 \mu\text{l}$ 加えて攪拌後、 4°C で1時間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、更にPBSに懸濁し、フローサイトメーターEPICS Elite (COULTER社製) を用いて解析を行った。対照として抗体無添加で上記と同様の操作を行い解析した。その結果を図17に示した。図17に示した様に、抗GD3キメラ抗体KM871および抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871はいずれも両細胞株と反応性を示した。抗GD3CDR移植抗体の中では、KM8871が最も強い反応性を示した。以上の結果は、抗GD3CDR移植抗体がメラノーマを始めとするGD3陽性ヒト腫瘍の診断、治療等に有用であることを示している。

(3) 抗GD3CDR移植抗体の in vitro 細胞障害活性 (CDC活性)

精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の in vitro 細胞障害活性を

評価するため、以下に示す方法に従い、CDC活性を測定した。

a. 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10)培地で培養したヒトメラノーマ培養細胞株G-361 (ATCC CRL1424) およびSK-MEL-28 (ATCC HTB72) のそれぞれ 5×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて37°Cで1時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10)培地で懸濁および遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4°Cで30分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10)培地を5ml加え、 1×10^6 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

b. 補体溶液の調製

3人の健常人の血清を混合し、ヒト補体源とした。使用時には、RPMI1640-FBS(10)培地で15%vol./vol.に希釈して補体溶液として用いた。

c. CDC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルにa.で調製した標的細胞溶液の50 μ lを加え (5×10^4 細胞/ウェル)、次いで抗GD3キメラ抗体KM871或いは抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871を各最終濃度0.05~50 μ g/mlとなる様に加え、室温で30分間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清を除去し、b.で調整したヒト補体溶液を150 μ l添加し、37°Cで1時間反応させた。遠心分離後、上清へ遊離した ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液、補体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、補体溶液の代わりに5規定水酸化ナトリウムを添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。CDC活性は、下式により求めた。

$$\text{CDC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

その結果を図18に示した。図18に示した様に、抗GD3キメラ抗体KM871および抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871は、いずれも両細胞株に対してCDC

活性を示し、特にヒトメラノーマ培養細胞株G-361に対しては非常に強い細胞障害活性を示すことが明らかとなった。抗GD3CDR移植抗体の中では、KM8871が最も強い細胞障害活性を示し、それは抗GD3キメラ抗体KM871の約1/3であった。

(4) 抗GD3CDR移植抗体のin vitro細胞障害活性 (ADCC活性)

精製した抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871のin vitro細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

a. 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10)培地で培養したヒトメラノーマ培養細胞株G-361 (ATCC CRL1424) およびSK-MEL-28 (ATCC HTB72) のそれぞれ 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を1.85MBq当量加えて37°Cで1時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10)培地で懸濁および遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4°Cで30分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10)培地を5ml加え、 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

b. エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品工業社製) 0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをPolymorphprep (Nycomed Pharma AS社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離 ($1,500 \sim 1,800 \times g$, 30分間) して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10)培地で3回遠心分離 ($1,500 \sim 1,800 \times g$, 5分間) して洗浄後、培地を用いて 5×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

c. ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルにa.で調製した標的細胞溶液の50 μ l (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いでb.で調製したエフェクター細胞溶液を100 μ l (5×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は50:1となる) 添加した。更に、抗GD3キメラ抗体KM871および抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871を各最終濃度0.05~50 μ g/mlとなる様に加え、37°Cで4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全

解離⁵¹Cr量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに5規定水酸化ナトリウムを添加し、上記と同様の操作を行い、上清の⁵¹Cr量を測定することにより求めた。ADCC活性は下式により求めた。

$$\text{ADCC活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}} \times 100$$

その結果を図19に示した。図19に示した様に、抗GD3キメラ抗体KM871および抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871は、いずれも両細胞株に対して強いADCC活性を示すことが明らかとなった。抗GD3キメラ抗体KM871および抗GD3CDR移植抗体KM8869、KM8870、KM8871の間では、その細胞障害活性に差は認められなかった。

以上の結果は、抗GD3キメラ抗体KM871と同様に抗GD3CDR移植抗体がGD3陽性ヒト腫瘍の診断、治療等に有用であることを示している。更に、抗GD3CDR移植抗体では、ヒトにおいてより免疫原性が低下し、その効果がより持続することが期待される。

抗GD3CDR移植抗体のうち、最も高活性を示したKM8871を生産する形質転換細胞クローンKM8871は平成11年7月22日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-6790として寄託されている。

実施例2. 抗GD3CDR移植抗体とヒトサイトカインとの融合蛋白質の作製

抗GD3CDR移植抗体とヒトサイトカインとの融合蛋白質の具体例として、抗GD3CDR移植抗体KM8871とヒトIL-2の融合蛋白質であるKM8871-hIL-2を以下の様にして作製し、その活性評価を行った。

1. hC γ 1とhIL-2との融合蛋白質をコードするcDNAの構築

(1) hC γ 1のcDNAの3'末端の約65塩基と成熟型hIL-2の完全長cDNAから成るcDNAを有するプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2の構築

プラスミドpBluescript SK(-) (Stratagene社製) の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの20mMトリス-塩酸 (pH8.5)、10mM塩化マグネシウ

ム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI（宝酒造社製）を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約2.95kbのApaI-BamHI断片を約2 μ g回収した。

次に、配列番号49および配列番号50に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNAを自動DNA合成機（380A、Applied Biosystems社製）を用いて合成した。得られた合成DNAの0.3 μ gずつを15 μ lの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、2 μ lの10倍緩衝液[500mMトリス-塩酸(pH7.6)、100mM塩化マグネシウム、50mM DTT)と2 μ lの10mM ATPを加え、更に10単位のT4 Polynucleotide Kinase（宝酒造社製）を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

次に、上記で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のApaI-BamHI断片0.1 μ gとリン酸化合成DNA0.05 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株（Stratagene社製）を形質転換し、図20に示したプラスミドpBSA-Bを得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

次に、上記で得られたプラスミドpBSA-Bの3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの33mMトリス-酢酸(pH7.9)、66mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム、0.5mM DTTおよび100 μ g/ml BSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SmaI（宝酒造社製）を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約3.00kbのEcoRI-SmaI断片を約2 μ g回収した。

次に、成熟型hIL-2の完全長cDNAを含むプラスミドpILL4[アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー(Agric. Biol. Chem.), 51, 1135 (1987)]

］を鋳型として、以下に示すPCRを行った。プラスミドpILL4の1ngを100 μ lの反応液[1倍濃度のEx Taq buffer(宝酒造社製)、200 μ M dNTPs、1.0 μ M rev1プライマー(配列番号51)、1.0 μ M fw2プライマー(配列番号52)および2.5単位のTaKaRa Ex Taq DNA polymerase(宝酒造社製)]に加え、100 μ lの鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラー (PJ480、PERKIN ELMER社製) にセットし、94 $^{\circ}$ Cにて3分間反応後、96 $^{\circ}$ Cにて30秒間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを30サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cにて7分間の反応を行った。該反応液をエタノール沈殿し、30 μ lの50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTT から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの33mM トリス-酢酸 (pH7.9)、66mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム、0.5mM DTTおよび100 μ g/ml BSAから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素SmaI (宝酒造社製) を加えて30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約0.41kbの EcoRI-SmaI断片を約1 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpBSA-BのEcoRI-SmaI断片0.1 μ gと成熟型hIL-2の完全長cDNAのPCR産物のEcoRI-SmaI断片0.1 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換した。形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia社製) に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia社製) により電気泳動し、挿入されたcDNAの塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有する図2 1に示したプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2を得た。

(2) hC γ 1の完全長cDNAと成熟型hIL-2の完全長cDNAから成るcDNAを有するプラスミドpBSShC γ 1-IL-2の構築

まず、特開平10-257893に記載のプラスミドpBSShC γ 1の3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシ

ウム、1mM DTTおよび100mM塩化ナトリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoT22I（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約0.92kbのApaI-EcoT22I断片を約1 μ g回収した。

次に、上記実施例2の1項（1）で得られたプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化ナトリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoT22I（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約3.40kbのApaI-EcoT22I断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpBS Δ hC γ 1のApaI-EcoT22I断片0.1 μ gとプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2のApaI-EcoT22I断片0.1 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、図22に示したプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2を得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、挿入されたcDNAの塩基配列を決定した結果、目的の塩基配列を有するプラスミドが得られたことを確認した。

2. KM8871-hIL-2の動物細胞を用いた安定発現

（1）KM8871-hIL-2の安定発現ベクターの構築

上記実施例1の6項（1）で得られた抗GD3CDR移植抗体KM8871の安定発現ベクター-pKANTEX641HLCDR Δ 69と上記実施例2の1項（2）で得られたhC γ 1とhIL-2との融合蛋白質をコードするcDNAを有するプラスミドpBS Δ hC γ 1-IL-2を用いてKM8871-hIL-2の安定発現ベクターを以下の様にして構築した。

実施例1の6項（1）で得られたプラスミドpKANTEX641HLCDR Δ 69の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る

緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの20mMトリス-塩酸（pH8.5）、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI（宝酒造社製）を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約12.57kbのApaI-BamHI断片を約2 μ g回収した。

次に、実施例2の1項（2）で得られたプラスミドpBShC γ 1-IL-2の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの20mMトリス-塩酸（pH8.5）、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI（宝酒造社製）を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約1.45kbのApaI-BamHI断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX641HLCDR_{Lm}-69由来のApaI-BamHI断片0.1 μ gとプラスミドpBShC γ 1-IL-2由来のApaI-BamHI断片0.1 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、図23に示したKM8871-hIL-2の安定発現ベクターpKANTEX8871-hIL2を得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit（Pharmacia社製）に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer（Pharmacia社製）により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

（2）KM8871-hIL-2の動物細胞での発現

上記実施例2の2項（1）で得られたKM8871-hIL-2の安定発現ベクターpKANTEX8871-hIL2の4 μ gを用いて実施例1の6項（2）に記載の方法に従い、YB2/0細胞（ATCC CRL1581）を形質転換し、最終的にG418（0.5mg/ml）およびMTX（200nM）による選択を行い、約4 μ g/10⁶細胞/24時間の発現量を示す形質転換細胞クロー

ンKM8871hIL2を得た。なお、KM8871hIL2は平成11年7月22日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-6791として寄託されている。

（3）KM8871-hIL-2の培養上清からの精製

上記実施例2の2項（2）で得られたKM8871-hIL-2を発現する形質転換細胞クローンKM8871hIL2を実施例1の6項（3）に記載の方法に従い、培養し、培養上清約3Lより約10.0mgの精製KM8871-hIL-2を得た。図24には、精製したKM8871-hIL-2のSDS-PAGEの結果を示した。図24に示した様に、精製したKM8871-hIL-2は、非還元条件下では分子量は約180Kdであり、還元条件下では約65Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、KM8871-hIL-2のH鎖とhIL-2およびL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量（H鎖とhIL-2：約64Kd、L鎖：約24Kd、分子全体：約176Kd）とほぼ一致し、抗体分子としての構造は、hIL-2の融合後においても保たれていることが確認された。

3. KM8871-hIL-2の活性評価

（1）KM8871-hIL-2のGD3に対する反応性（ELISA法）

精製したKM8871-hIL-2のGD3（DIA-IATRON社製）に対する反応性を実施例1の2項に記載の方法に従い、測定した。但し、二次抗体溶液として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体（American Qualex社製、1%BSA-PBSで3000倍に希釈して使用）を用いた。第25図は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるGD3の量を20pmol/ウェルに固定し、添加する抗GD3CDR移植抗体KM8871およびKM8871-hIL-2の濃度を変化させて反応性を検討した結果である。第25図に示した様に、KM8871-hIL-2は抗GD3CDR移植抗体KM8871と同等以上のGD3に対する結合活性を有していることが示された。第26図は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるガングリオシドの種類を変えて（吸着量：20pmol/ウェル）、一定濃度（10μg/ml）の抗GD3CDR移植抗体KM8871およびKM8871-hIL-2の反応性を検討した結果である。第26図に示した様に、KM8871-hIL-2は抗GD3CDR移植抗体KM8871と同様にGD3に対して強く結合することが示されたが、KM8871-hIL-2は更にGD2に対しても強く結合することが確認された。KM8871-hIL-2のGD2との交差反応性の原因としては、hIL-2とGD2の結合の可能性の他、hIL-2の融合による抗体V領域の立体構造の変化による結合特異性の変化の可能性、hIL-2の融合による抗体C領域の立体構造の変

化による二次抗体の反応性の変化の可能性等が考えられる。

(2) KM8871-hIL-2の細胞表面のGD3に対する反応性 (蛍光抗体法)

実施例1の7項(2)に記載の方法により、精製したKM8871-hIL-2のヒト癌細胞との反応性を測定した。その結果を図27に示す。図27に示したように、KM871-hIL-2はヒトメラノーマ培養細胞株G361に対し、抗GD3CDR移植抗体KM8871とほぼ同等の強い反応性を示した。この結果は、KM8871-hIL-2がメラノーマを始めとするGD3陽性ヒト腫瘍の治療等に有用であることを示している。

(3) KM8871-hIL-2のhIL-2活性の評価

精製したKM8871-hIL-2のhIL-2としての活性を以下に示す方法に従い、測定した。hIL-2に対して濃度依存的な増殖を示すマウスT細胞株CTLL-2 (ATCC TIB214) を 2×10^5 細胞/mlの濃度でRPMI1640-FBS(10)培地に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に50 μ l/ウェルずつ分注した。各ウェルにhIL-2 (R&D SYSTEMS社製) 或いは精製したKM8871-hIL-2をRPMI1640-FBS(10)培地で各種濃度に希釈した溶液の50 μ lを加え、5%CO₂インキュベーター内で37°Cで30時間培養した。培養後、Cell Counting Kit (同仁化学研究所製) を用いて使用説明書に従い、生細胞数を測定した。その結果を図28に示した。図28に示した様に、KM8871-hIL-2はhIL-2と同程度のCTLL-2細胞の増殖支持活性を示した。以上の結果は、KM8871-hIL-2のhIL-2としての活性は抗GD3CDR移植抗体KM8871との融合後においても保たれていることを示している。

(4) KM8871-hIL-2によるヒトエフェクター細胞の活性化と細胞障害活性の増強

KM8871-hIL-2のhIL-2部分によるヒトエフェクター細胞の活性化と、それに伴う細胞障害活性の増強をin vitroで評価するため、以下に示す方法に従い、細胞障害活性を測定した。

a. 標的細胞溶液の調製

実施例1の7項(4)のa. に記載の方法に従い、ヒトメラノーマ培養細胞株G361を 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

b. ヒトエフェクター細胞溶液の調製

実施例1の7項(4)のb. に記載の方法に従い、健常人静脈血より単核球を分離後 5×10^6 細胞/mlの各密度に再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

c. ヒトエフェクター細胞の活性化

96ウェルU字底プレート（Falcon社製）の各ウェルにb.で調製したエフェクター細胞溶液100 μ lを分注した（ 5×10^4 細胞/ウェル）。さらに抗GD3CDR移植抗体KM8871或いはKM8871-hIL-2を各最終濃度11.1nMとなる様に50 μ lずつ添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーター内で24時間反応させた。

d. 細胞障害活性の測定

c.で用意したプレートの各ウェルにa.で調製した標的細胞溶液の50 μ l（ 1×10^4 細胞/ウェル）を添加した。この時、エフェクター細胞と標的細胞の比は5:1となる。37 $^{\circ}$ Cで4時間反応後、プレートを遠心分離し、上清の⁵¹Cr量を γ -カウンターにて測定した。自然解離⁵¹Cr量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の⁵¹Cr量を測定することにより求めた。全解離⁵¹Cr量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の⁵¹Cr量を測定することにより求めた。細胞障害活性は下式により求めた。

$$\text{ADCC活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}} \times 100$$

その結果を図29に示した。図29に示した様に、KM8871-hIL-2は抗GD3CDR移植抗体KM8871よりも強い細胞障害活性を誘導することが明らかとなった。本結果は、KM8871-hIL-2を用いてヒトエフェクター細胞を活性化でき、細胞障害活性が増強されることを示したものであり、ヒトへの臨床応用においても同様の効果が期待できることを示唆する結果である。

実施例3. 抗GD3キメラ抗体とヒトサイトカインとの融合蛋白質の作製

抗GD3キメラ抗体とヒトサイトカインとの融合蛋白質の具体例として、抗GD3キメラ抗体KM871とヒトIL-2の融合蛋白質であるKM871-hIL-2を以下の様にして作製し、その活性評価を行った。

1. KM871-hIL-2の動物細胞を用いた安定発現

(1) KM871-hIL-2の安定発現ベクターの構築

抗GD3キメラ抗体KM871の安定発現ベクターpKANTEX641（特開平5-304989）と実施例2の1項（2）で得られたhC γ 1とhIL-2との融合蛋白質をコードするcDNAを有するプラスミドpBShC γ 1-IL-2を用いてKM871-hIL-2の安定発現ベクターを以

下の様にして構築した。

実施例1の6項(1)で得られたプラスミドpKANTEX641の3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI (宝酒造社製)を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約12.57kbのApaI-BamHI断片を約2 μ g回収した。

次に、実施例2の1項(2)で得られたプラスミドpBShC γ 1-IL-2の3 μ gを10 μ lの10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの20mM トリス-塩酸 (pH8.5)、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100mM塩化カリウムから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素BamHI (宝酒造社製)を加えて30°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて添付の説明書に従い、約1.45kbのApaI-BamHI断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX641由来のApaI-BamHI断片0.1 μ gとプラスミドpBShC γ 1-IL-2由来のApaI-BamHI断片0.1 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、図30に示したKM871-hIL-2の安定発現ベクターpKANTEX871-hIL2を得た。得られたプラスミドの10 μ gを用い、AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia社製)に添付の説明書に従って反応後、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia社製)により電気泳動し、塩基配列を決定した結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

(2) KM871-hIL-2の動物細胞での発現

上記実施例3の1項(1)で得られたKM871-hIL-2の安定発現ベクターpKANTEX871-hIL2の4 μ gを用いて実施例1の6項(2)に記載の方法に従い、YB2/0細胞

(ATCC CRL1581) を形質転換し、最終的にG418 (0.5mg/ml) およびMTX (200nM) による選択を行い、約 $4\mu\text{g}/10^6$ 細胞/24hrの発現量を示す形質転換細胞クローン KM871hIL2を得た。なお、KM871hIL2は平成11年10月19日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-6918として寄託されている。

(3) KM871-hIL-2の培養上清からの精製

上記実施例3の1項(2)で得られたKM871-hIL-2を発現する形質転換細胞クローンKM871hIL2を実施例1の6項(3)に記載の方法に従い、培養し、培養上清約3Lより約10.0mgの精製KM871-hIL-2を得た。図31には、精製したKM871-hIL-2のSDS-PAGEの結果を示した。図31に示した様に、精製したKM871-hIL-2は、非還元条件下では分子量は約180Kdであり、還元条件下では約65Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、KM871-hIL-2のH鎖とhIL-2およびL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量（H鎖とhIL-2：約64Kd、L鎖：約24Kd、分子全体：約176Kd）とほぼ一致し、抗体分子としての構造はhIL-2の融合後においても保たれていることが確認された。

2. KM871-hIL-2のin vitro活性評価

(1) KM871-hIL-2のGD3に対する反応性 (ELISA法)

精製したKM871-hIL-2のGD3 (DIA-IATRON社製) に対する反応性を実施例1の2項に記載の方法に従い、測定した。但し、二次抗体溶液として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体 (American Qualex社製、1%BSA-PBSで3000倍に希釈して使用) を用いた。図32は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるGD3の量を20pmol/ウェルに固定し、添加する抗GD3キメラ抗体KM871およびKM871-hIL-2の濃度を変化させて反応性を検討した結果である。図32に示した様に、KM871-hIL-2は抗GD3キメラ抗体KM871と同等以上のGD3に対する結合活性を有していることが示された。図33は、ELISA用のプレートの各ウェルに吸着させるガングリオシドの種類を変えて（吸着量：20pmol/ウェル）、一定濃度（6.7nM）の抗GD3キメラ抗体KM871およびKM871-hIL-2の反応性を検討した結果である。図33に示した様に、KM871-hIL-2は抗GD3キメラ抗体KM871と同様にGD3のみに対して強く結合することが示され、hIL-2の付加はKM871の抗原特異性に大きな影響を与えないことが示された。

(2) KM871-hIL-2の細胞表面のGD3に対する反応性 (蛍光抗体法)

実施例1の7項(2)に記載の方法により、精製したKM871-hIL-2のヒト癌細胞との反応性を測定した。その結果を図34に示す。図34に示したように、KM871-hIL-2はヒトメラノーマ培養細胞株G361およびSK-MEL-28に対し、抗GD3キメラ抗体KM871とほぼ同等の強い反応性を示した。この結果は、KM871-hIL-2がメラノーマを始めとするGD3陽性ヒト腫瘍の治療等に有用であることを示している。

(3) KM871-hIL-2のhIL-2活性の評価

精製したKM871-hIL-2のhIL-2としての活性を実施例2の3項(2)に従い測定し、その結果を図35に示した。図35に示した様に、KM871-hIL-2はhIL-2と同程度のCTLL-2細胞の増殖支持活性を示した。以上の結果は、KM871-hIL-2のhIL-2としての活性は抗GD3キメラ抗体KM871との融合後においても保たれていることを示している。

(4) KM871-hIL-2によるヒトリンパ球の活性化

KM871-hIL-2のIL-2部分によるヒトリンパ球の活性化と、それに伴う細胞障害活性の増強を*in vitro*で評価するため、実施例1の7項(4)に記載した方法の細部に変更を加えた以下に示す方法に従い、細胞障害活性を測定した。

a. 標的細胞溶液の調製

実施例1の7項(4)のa.に記載の方法に従い、ヒトメラノーマ培養細胞株G361を 2×10^5 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

b. エフェクター細胞溶液の調製

実施例1の7項(4)のb.に記載の方法に従い、健常人静脈血より単核球を分離後 1×10^7 細胞/mlの各密度に再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

c. リンパ球の活性化

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルにb.で調製したエフェクター細胞溶液 $50 \mu\text{l}$ を分注した (5×10^4 細胞/ウェル)。さらに抗GD3キメラ抗体KM871もしくはKM871-hIL-2を添加したRPMI1640-FBS(10)培地を各最終濃度1nMとなる様に $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し (KM871の分子量は150Kd、KM871-hIL-2の分子量は180Kdとして計算)、 37°C 、5%炭酸ガス存在下で72時間静置した。

d. 細胞障害活性の測定

c.で用意したプレートの各ウェルにa.で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{l}$ (1×10^4

細胞/ウェル) を添加した。このときエフェクター細胞と標的細胞の比は5:1となる。さらに抗GD3キメラ抗体KM871もしくはKM871-hIL-2を添加したRPMI1640-FBS(10)培地を各最終濃度1nMを保つように50 μ lずつ加えて37°Cで4時間反応後、プレートを遠心分離し、上清の⁵¹Cr量を γ -カウンターにて測定した。自然解離⁵¹Cr量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の⁵¹Cr量を測定することにより求めた。全解離⁵¹Cr量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の⁵¹Cr量を測定することにより求めた。細胞障害活性は実施例 7 項 (4) のb. に記載した方法により求め、その結果を図36に示した。図36に示した様に、KM871-hIL-2はKM871よりも強い細胞障害活性を誘導することが明らかとなった。この結果から、KM871-hIL-2はGD3陽性ヒト腫瘍の臨床応用においても、hIL-2部分を介したヒトリンパ球の活性化によって、KM871の持つ治療効果をさらに増強することが期待される。

3. KM871-hIL-2の *in vivo* 活性評価

(1) マウス同系移植モデル用B16細胞のGD3合成酵素遺伝子導入形質転換株の作製

a. GD3合成酵素遺伝子の安定発現ベクターの構築

GD3合成酵素遺伝子の動物細胞発現用ベクターpAMo-GD3 (W094/23020) の3 μ gを10 μ lの10mMトリス-塩酸 (pH7.5)、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素HindIII (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 μ g/ml BSAおよび0.01%トライトンX-100から成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、制限酵素消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い、約2.1kbの平滑末端HindIII- NotI断片を約2 μ g回収した。

次に、抗GD3キメラ抗体発現ベクターpKANTEX641の3 μ gを10 μ lの50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから

成る緩衝液に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、DNA Blunting Kit（宝酒造社製）を用い、制限酵素消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTから成る緩衝液とし、更に10単位の制限酵素NruI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 μ lの50mMトリス-塩酸（pH7.5）、および10mM塩化マグネシウムから成る緩衝液とし、更に10単位の5' 末端脱リン酸化酵素Calf intestine由来Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させて5' 末端を脱リン酸化した。該反応液をフェノール処理後アガロースゲル電気泳動にて分画し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて添付の説明書に従い、約9.4kbの平滑末端・脱リン酸化EcoRI- NruI断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX641由来のEcoRI- NruI断片0.1 μ gとプラスミドpAMo-GD3由来のHindIII- NotI断片0.1 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、図37に示したGD3合成酵素の安定発現ベクターpKANTEXGD3を得た。

b. GD3合成酵素発現ベクターのB16細胞への導入

上記実施例3の3項（1）のa. で得られたGD3合成酵素遺伝子の安定発現ベクターpKANTEXGD3の4 μ gを用いて実施例1の6項（2）に記載の方法に従い、B16・F10細胞（ATCC CRL1581）を形質転換し、最終的にG418（0.5mg/ml）による選択を行い、形質転換細胞クローンB16・8-3およびB16・29-10を得た。

c. 蛍光抗体法によるGD3発現株のGD3発現量の解析

実施例3の3項（1）のb. で得られたGD3合成酵素遺伝子トランスフェクタントB16・8-3およびB16・29-10、さらに親株のB16・F10細胞のそれぞれ1 $\times 10^6$ 細胞をPBSに懸濁させ、マイクロチューブ（Treff社製）に取り、遠心分離（2000rpm、2分間）して細胞を洗浄後、抗GD3キメラ抗体KM871を50 μ l（1%BSA-PBSで5 μ g/mlに調整した溶液、陰性対照は1%BSA-PBSのみ）加えて攪拌し、4°Cで1時間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、ビオチン標識したヤギ抗ヒトIgG（H+L）溶液（VECTOR社製、1%BSA-PBSで400倍希釈して使用）を100 μ l加えて攪拌

し、4 で1時間反応させた。PBSで3回遠心分離して洗浄した後、ストレプトアビジン 標識したCy5色素溶液 (GIBCO社製Streptavidin-RED670、1%BSA-PBSで100倍希釈して使用) を100 μ l加えて攪拌し、4°Cで30分間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離して洗浄した後、更にPBSに懸濁し、フローサイトメーターEPICS Elite (COULTER社製) を用いて解析を行った。その結果を図38に示した。図38に示した様に、抗GD3キメラ抗体KM871はB16・8-3およびB16・29-10のみに反応し、親株のB16・F10細胞には反応性を示さなかった。以上の結果は、B16・8-3およびB16・29-10の両トランスフェクタントは表面にGD3を発現し、B16細胞の由来であるC57 BL/6マウスに移植することによりKM871-hIL-2のin vivo抗腫瘍効果測定用のモデルとなりうることを示している。

(2) KM871-hIL-2のin vivo抗腫瘍効果の測定

a. GD3発現形質転換株B16・29-10を移植したマウスによる評価

実施例3の3項(1)のb. で得られたGD3発現B16細胞B16・29-10を 2.5×10^6 個/mlでPBSに懸濁し、C57 BL/6 Cr slcマウス (雌、8週齢、日本SLC社製) の尾静脈より100 μ l注入した。さらに腫瘍移植当日より1日1回、5日間連続でKM871を50または200 μ g/日、あるいはKM871-hIL-2を20または50 μ g/日で尾静脈投与した。腫瘍移植後15日目に肺を摘出し、表面の黒色の転移巣を肉眼で計数した結果を第3表および図39に示す。

第 3 表

グループ		肺表面の転移巣の数 (個)	平均値
抗体非投与群		147/136/106/72/70	106.2
KM871-hIL-2	20 μ g	20/15/11/2/2/1	8.5
KM871-hIL-2	50 μ g	15/12/5/2/0/0	5.7
KM871	50 μ g	185/114/86/77	115.5
KM871	200 μ g	113/87/86/86/77/55	84

第3表および図39に示したように、クローンB16・29-10を用いたモデルマウスに対し、KM871-hIL-2はKM871よりも明らかに強い抗転移効果を示した。

b. GD3発現形質転換株B16・8-3を移植したマウスによる評価

実施例3の3項(1)のb. で得られたGD3発現B16細胞B16・8-3を用い、上記実

施例3の3項(2)のa.に記載の方法に従いKM871-hIL-2の抗転移効果を測定した。用量はKM871、KM871-hIL-2ともに40または100 μ g/日である。その結果を第4表および図40に示す。

第4表

グループ		肺表面の転移巣の数(個)	平均値
抗体非投与群		170/128/113/66/42/16/0	76.4
KM871-hIL-2	40 μ g	1/0/0	0.3
KM871-hIL-2	100 μ g	3/0/0	1
KM871	40 μ g	128/70/30	76
KM871	100 μ g	26/20/17	21

第4表および図40に示したように、クローンB16-8-3を用いたモデルマウスに対しても、KM871-hIL-2はKM871よりもさらに強い抗転移効果を示した。

c. KM871とhIL-2の併用投与との比較

実施例3の3項(1)のb.で得られたGD3発現B16細胞B16-29-10を 2.5×10^6 個/mlでPBSに懸濁し、C57 BL/6 Cr slcマウス(雌、8週齢、日本SLC)の尾静脈より100 μ l注入した。さらに腫瘍移植当日より1日1回、5日間連続でKM871-hIL-2を6 μ g(0.0333nmol)または18 μ g/日(0.1nmol)で尾静脈投与した。さらに別の群に対して、投与したKM871-hIL-2に相当する量のKM871とhIL-2(Peprotech社製)の混合溶液[KM871 5 μ g(0.0333nmol)とhIL-2 1 μ g(0.0667nmol)、またはKM871 15 μ g(0.1nmol)とhIL-2 3 μ g(0.2nmol)]を腫瘍移植当日より1日1回、5日間連続で尾静脈投与した。腫瘍移植後15日目に肺を摘出し、表面の黒色の転移巣を肉眼で計数した結果を第5表および図41に示す。

第5表

グループ		肺表面の転移巣の数(個)	平均値
抗体非投与群		163/132/97/95/88/57	105.3
KM871-hIL-2	6 μ g	26/26/17/12/8	17.8
KM871-hIL-2	18 μ g	43/34/28/13/2	24
KM871 + hIL-2	5 μ g + 1 μ g	215/117/97/85/56	114
KM871 + hIL-2	15 μ g + 3 μ g	92/61/48/46/42	57.8

第5表および図41に示したように、クローンB16-29-10を用いたモデルマウスに

対し、KM871-hIL-2は等量のKM871とhIL-2の併用投与よりもさらに強い抗転移効果を示した。このことはKM871-hIL-2の示すin vivo抗腫瘍効果は、単にKM871とhIL-2の相加的なものではなく、腫瘍に集積したKM871-hIL-2のhIL-2部分が周辺のリンパ球を活性化し、効率的に抗腫瘍免疫を誘導したことを示しており、KM871-hIL-2は従来のhIL-2単独あるいは抗体との併用投与よりもさらに治療効果が高く、しかもhIL-2に由来する副作用を低減した治療剤となりうる可能性を示している。

d. B16・29-10 細胞の固形腫瘍・初期モデルによる評価

実施例3の3項(1)のb. で得られたGD3発現B16細胞B16・29-10を 1×10^7 個/mlでPBSに懸濁し、C57 BL/6 マウス(雄、7週齢、日本チャールスリバー)の腹側部皮下に50 μ l 移植した。下記の投与群を設定し、腫瘍移植当日より1日1回、5日間連続で各薬剤を尾静脈投与した。

・抗体非投与群

・ h I L - 2	10 μ g / 日	(0.667nmol)
・ KM871	50 μ g / 日	(0.333nmol)
・ KM871-hIL-2	60 μ g / 日	(0.333nmol)

実験は各群5匹で行った。薬剤はクエン酸緩衝液で希釈し、200 μ l / 匹となるように調製した。移植後5日目より経時的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は、各投与群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値に対する比、および投与開始後の生存日数で判定した。腫瘍体積は下式にて算出した。

$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径})^2 \times \text{長径} \times 0.5$$

各群の腫瘍体積の平均値を第6表、各群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値の比の結果を第7表および図42、生存日数の結果を第8表に示す。

第 6 表

投与 日数	抗体非 投与群	KM871	hIL-2	KM871-hIL-2
0	0	0	0	0
5	75	60	36	49
7	131	82	67	34
9	306	146	115	87
11	756	494	359	231
12	1325	939	489	332
14	2333	1701	1147	733
16	3656	3331	2268	1432
20	7799	8345	5765	3381

単位は mm³

第 7 表

投与 日数	抗体非 投与群	KM871	hIL-2	KM871-hIL-2
0	1.000	1.000	1.000	1.000
5	1.000	0.796	0.484	0.656
7	1.000	0.624	0.510	0.261
9	1.000	0.477	0.376	0.285
11	1.000	0.654	0.475	0.305
12	1.000	0.709	0.369	0.251
14	1.000	0.729	0.492	0.314
16	1.000	0.911	0.620	0.392
20	1.000	1.070	0.739	0.434

第 8 表

グループ	投与開始後の生存日数(日)	平均値(日)
抗体非投与群	24 / 27 / 27 / 30 / 30	27.6
h I L - 2	26 / 28 / 32 / 32 / 33	30.2
KM871	27 / 30 / 30 / 32 / 35	30.8
KM871-hIL-2	32 / 32 / 43 / 51 / 57	43.0

第6表、第7表、第8表および図42に示したように、KM871-hIL-2はhIL-2単独、あるいは抗体単独よりもさらに高い増殖抑制効果および延命効果を示した。

e. B16-29-10細胞の固形腫瘍・進行期モデルによる評価

GD3 発現 B16 細胞 B16-29-10 を 1×10^8 個/ml で PBS に懸濁し、C57 BL/6 マウス（雄、7 週齢、日本チャールスリバー）の腹側部皮内に $50 \mu\text{l}$ 移植した。下記の投与群を設定し、腫瘍移植後 6 日目に実施例 3 の 3 項 (2) の d. に記載の測定方法により腫瘍体積を計算し、 $10 \sim 80 \text{mm}^3$ の範囲内の個体を選抜し、1 日 1 回、8 日間連続で下記の薬剤を尾静脈投与した。

・抗体非投与群

・ h I L - 2	10 μg /日	(0.667nmol)
・ KM871	50 μg /日	(0.333nmol)
・ KM871	200 μg /日	(1.33nmol)
・ KM871-hIL-2	24 μg /日	(0.133nmol)
・ KM871-hIL-2	60 μg /日	(0.333nmol)

実験は KM871-hIL-2 60 μg /日投与群のみ 3 匹、その他は全て各群 5 匹で行った。薬剤はクエン酸緩衝液で希釈し、200 μl /匹となるように調製した。移植日より経時的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は、各処理群の各マウスの測定日の腫瘍体積と投与開始日の腫瘍体積の比の平均値（以降 V/V_0 と表記）の非投与群の V/V_0 に対する比、および投与開始後の生存日数で判定した。腫瘍体積は実施例 3 の 3 項 (2) の d. に記載の方法に従い算出した。

各群の V/V_0 の結果を第 9 表、各群の V/V_0 の非投与群の V/V_0 に対する比の結果を第 10 表および図 43、生存日数の結果を第 11 表に示す。

第 9 表

処理 日数	抗体非 投与群	hIL-2 10 μg	KM871 50 μg	KM871 200 μg	KM871-hIL-2 24 μg	KM871-hIL-2 60 μg
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	2.15	3.03	2.57	1.86	2.09	1.54
4	5.36	6.15	6.37	4.98	3.79	2.88
6	13.18	14.31	14.43	9.35	8.12	6.85
7	16.45	17.68	18.99	11.22	10.05	8.58
8	21.09	21.31	24.05	16.56	13.04	11.50
9	28.95	28.42	33.43	21.08	16.10	15.19
11	54.97	48.52	56.07	42.65	29.13	27.01
13	93.70	86.85	100.34	74.16	58.17	49.80

第 10 表

処理 日数	抗体非 投与群	hIL-2 10 μ g	KM871 50 μ g	KM871 200 μ g	KM871-hIL-2 24 μ g	KM871-hIL-2 60 μ g
0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	1.000	1.406	1.196	0.862	0.973	0.718
4	1.000	1.147	1.187	0.928	0.706	0.537
6	1.000	1.086	1.096	0.710	0.616	0.520
7	1.000	1.075	1.155	0.682	0.611	0.522
8	1.000	1.011	1.141	0.785	0.619	0.545
9	1.000	0.982	1.155	0.728	0.556	0.525
11	1.000	0.883	1.020	0.776	0.530	0.491
13	1.000	0.927	1.071	0.791	0.621	0.531

第 11 表

グループ	投与開始後の生存日数(日)	平均値(日)
抗体非投与群	15 / 23 / 23 / 24 / 34	23.8
h I L-2	15 / 15 / 18 / 27 / 29	20.8
KM871 50 μ g	19 / 20 / 23 / 30 / 34	25.2
KM871 200 μ g	18 / 19 / 23 / 27 / 34	24.2
KM871-hIL-2 24 μ g	29 / 38 / 39 / 41 / 49	39.2
KM871-hIL-2 60 μ g	29 / 32 / 37	32.7

第9表、第10表、第11表および図43に示したように、KM871-hIL-2はhIL-2単独、あるいは抗体単独よりもさらに高い増殖抑制効果および延命効果を示した。

e. B16・29-10細胞の固形腫瘍・進行期モデルにおけるKM871とKM871-hIL-2の併用効果

実施例3の3項(1)のb.で得られたGD3発現B16細胞B16・29-10を 1×10^8 個/mlでPBSに懸濁し、C57 BL/6マウス(雄、7週齢、日本チャールスリバー)の腹側部皮内に50 μ l移植した。下記の投与群を設定し、腫瘍移植後6日目(第0日)に実施例3の3項(2)のd.に記載の測定方法に従い腫瘍体積を計算し、10~100mm³の範囲内の個体を選抜し、下記の薬剤をそれぞれ尾静脈投与した。

・抗体非投与群

・h I L-2

10 μ g/日 \times 5日連続投与(第0日~第4日)

- ・ KM871 800 μ g/日 \times 単回投与 (第 0 日)
- ・ KM871 + KM871-hIL-2 800 μ g/日 \times 単回投与 (第 0 日)
+ 15 μ g/日 \times 5 日連続投与 (第 0 日 \sim 第 4 日)
- ・ KM871 + KM871-hIL-2 800 μ g/日 \times 単回投与 (第 0 日)
+ 60 μ g/日 \times 5 日連続投与 (第 0 日 \sim 第 4 日)

実験は各群 5 匹で行った。薬剤はクエン酸緩衝液で希釈し、200 μ l/匹となるように調製した。移植日より経時的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は、各処理群の V/V_0 の非投与群の V/V_0 に対する比、および投与開始後の生存日数で判定した。腫瘍体積は実施例 3 の 3 項 (2) の d. に記載の方法に従い算出した。各群の V/V_0 の結果を第 12 表、各群の V/V_0 の非投与群の V/V_0 に対する比の結果を第 13 表および図 44、生存日数の結果を第 14 表に示す。

第 12 表

処理 日数	抗体非投与群	hIL-2 10 μ g \times 5	KM871 800 μ g \times 1	KM871 + KM871-hIL-2 800 μ g \times 1 + 15 μ g \times 5	KM871 + KM871-hIL-2 800 μ g \times 1 + 60 μ g \times 5
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	3.09	2.76	1.81	1.68	1.49
4	8.54	4.10	4.10	2.56	2.68
6	17.48	9.96	14.17	6.42	6.03
8	46.84	20.63	25.08	11.62	10.58
10	63.99	33.09	49.33	22.98	17.65
12	104.89	57.06	75.47	38.46	27.76

第 13 表

処理 日数	抗体非投与群	hIL-2 10 μ g \times 5	KM871 800 μ g \times 1	KM871 + KM871-hIL-2 800 μ g \times 1 + 15 μ g \times 5	KM871 + KM871-hIL-2 800 μ g \times 1 + 60 μ g \times 5
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	1.00	0.89	0.59	0.54	0.48
4	1.00	0.48	0.48	0.30	0.31
6	1.00	0.57	0.81	0.37	0.34
8	1.00	0.44	0.54	0.25	0.23
10	1.00	0.52	0.77	0.36	0.28
12	1.00	0.54	0.72	0.37	0.26

第 14 表

グループ	投与開始後の生存日数(日)	平均値(日)
抗体非投与群	9 / 12 / 16 / 16 / 29	16.4
h I L-2	17 / 17 / 24 / 32 / 36	25.2
KM871	8 / 16 / 17 / 26 / 31	19.6
KM871+KM871-hIL-2 15 μ g	17 / 24 / 29 / 32 / 43	29.7
KM871+KM871-hIL-2 60 μ g	29 / 29 / 36 / 36 / 43	34.6

第12表、第13表、図44および第14表に示したように、KM871とKM871-hIL-2の併用投与は、hIL-2単独、あるいは抗体単独よりもさらに高い増殖抑制効果および延命効果を示した。この結果は、KM871-hIL-2とKM871の併用投与は、GD3陽性の癌に対する優れた治療法となりうる可能性を示している。

4. KM871-hIL-2の *in vivo* 抗腫瘍メカニズムの解析

(1) KM871-hIL-2によるマウスエフェクター細胞の活性化と細胞障害活性の増強

KM871-hIL-2のhIL-2部分によるマウスエフェクター細胞の活性化と、それに伴う細胞障害活性の増強を評価するため、以下に示す方法に従い細胞障害活性を測定した。

a. マウスエフェクター細胞溶液の調製

C57 BL/6 マウス（雌、8週齢、日本SLC）について下記の投与群を設定し、各薬剤を尾静脈投与した。

- ・抗体非投与群
- ・h I L-2 10 μ g (0.667nmol) /日×5日間連続投与（第0日～第4日）
- ・KM871-hIL-2 60 μ g (0.333nmol) /日×単回投与（第2日）
- ・KM871-hIL-2 60 μ g (0.333nmol) /日×2回投与（第0日、第2日）

第4日に全ての投与が終了した後に脾臓を摘出し、6mlずつのRPMI1640-FBS(10)培地中でスライドグラスを用いてすりつぶした後に70 μ m径ナイロンメッシュ（ファルコン社製）を通して脾臓細胞の懸濁液を調製した。マウスリンパ球比重分離液リンフォライト-M 5mlを15mlチューブに入れ、得られた脾臓細胞懸濁液の内5mlを上にな静かに重層し、室温、1000×gで20分間遠心分離した。界面のリンパ球層をスポイトで回収し、10mlのRPMI1640-FBS(10)培地を加えて遠心分離

(800×g、4℃、10分)し、上清を廃棄して洗浄を行った。再度洗浄操作を繰り返し、最終的に 2×10^7 個/mlとなるようにRPMI1640-FBS(10)培地を加えエフェクター細胞溶液を調製した。

b. 標的細胞溶液の調製

実施例1の7項(4)のa.に記載の方法に従い、実施例3の3項(1)のb.で得られたGD3発現B16細胞B16・29-10を ^{51}Cr 標識し、 2×10^5 細胞/mlの標的細胞溶液を調製した。

c. 細胞障害活性の測定

96穴U底プレートの各ウェルにa.で調製したエフェクター細胞溶液100 μl 、b.で調製した標的細胞溶液の50 μl (1×10^4 細胞/ウェル)およびRPMI1640-FBS(10)培地で濃度を段階的に希釈したKM871を終濃度が0、0.05、0.5、5、50 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。この時、エフェクター細胞と標的細胞の比は200:1となる。37℃で10時間反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。細胞障害活性は実施例1の7項(4)のb.に記載した方法で算出した。その結果を図45に示す。図45に示した様に、KM871-hIL-2は単回および2回投与のいずれにおいてもhIL-2の5回投与を上回る細胞障害活性を誘導することが明らかになった。

(2)KM871-hIL-2によって活性化されるエフェクター細胞の解析(蛍光抗体法)

KM871-hIL-2の投与による、マウスの体内の抗腫瘍効果に関わるエフェクター細胞に対する影響を測定するため、以下の手順でフローサイトメーターによる解析を行った。実施例3の3項(1)のb.で得られたGD3発現B16細胞B16・29-10を 1×10^7 個/mlでPBSに懸濁し、C57 BL/6マウス(雄、7週齢、日本チャールスリバー)の腹側部皮下に50 μl 移植した。下記の投与群を設定し、腫瘍移植当日より1日1回、5日間連続で各薬剤を尾静脈投与した。

・抗体非投与群

・hIL-2

10 $\mu\text{g/日}$

(0.667nmol)

・ KM871-hIL-2 60 μ g/日 (0.333nmol)

また、KM871-hIL-2 (60 μ g/日) に関しては投与回数を2回(移植当日および移植後3日目)に減らした群も設定した。実験は各群2匹で行った。移植後4日目に、すべての投与が終了した後に脾臓を摘出し、6ml ずつの RPMI1640-FBS(10)培地中でスライドグラスを用いてすりつぶした後に70 μ m 径ナイロンメッシュ(ファルコン社製)を通して脾臓細胞の懸濁液を調製した。マウスリンパ球比重分離液リンフォライト-M 5ml を15ml チューブに入れ、得られた脾臓細胞懸濁液の内5ml を上に静かに重層し、室温、1000 \times gで20分間遠心分離した。界面のリンパ球層をスポイトで回収し、10ml の RPMI1640-FBS(10)培地を加えて遠心分離(800 \times g、4 $^{\circ}$ C、10分)し、上清を廃棄して洗浄を行った。再度洗浄操作を繰り返し、最終的に3 \times 10⁷個/ml となるように5%マウス血清(ケミコン社製)を含む1%BSA-PBSを加え脾臓リンパ球懸濁液を調製した。96穴U底プレートにリンパ球懸濁液を50 μ l 加え、さらに下記の各種蛍光標識抗体を加え、4 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。

・ ファイコエリスリン (以下 PE と表記)

標識ラット抗マウス CD4 抗体 (CEDERLANE 社製)	3 μ l
・ FITC 標識ラット抗マウス CD8 抗体 (Serotec 社製)	5 μ l
・ PE 標識ラット抗マウス NK 細胞抗体 (Serotec 社製)	15 μ l
・ FITC 標識ラット抗マウスマクロファージ抗体 (Serotec 社製)	10 μ l
・ PE 標識ラット抗マウス好中球抗体 (Caltac 社製)	5 μ l

フローサイトメーター EPICS ELITE (Coulter 社製) を用いて解析し、各抗体によって染色された集団の、全生細胞中の割合を算出した結果を第15表および図46に示す。表中の数字は各群2匹の平均値を示す(単位は%)。

第 15 表

	CD4+T細胞	CD8+T細胞	NK細胞	マクロファージ	好中球
未処理	28.5	21.7	3.71	0.643	7.63
hIL-2 5回投与	21.3	20.7	16.2	0.448	13.9
KM871-hIL-2 5回投与	16.1	20.9	18.6	0.392	7.26
KM871-hIL-2 2回投与	27.2	28.8	17.0	0.498	6.06

第15表および図46に示すように、hIL-2、KM871-hIL-2投与により、共にNK細胞の脾臓リンパ球中における割合の増加が観察された。この結果はKM871-hIL-2による抗腫瘍効果の増強はNK細胞の増殖を介している可能性を示している。

(3) In vivo depletion 法を用いた抗腫瘍効果のエフェクター細胞解析 (in vitro 細胞障害活性)

下記に示す方法を用い、抗腫瘍免疫におけるIL-2応答性のエフェクター細胞であるNK細胞、CD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）、CD8陽性T細胞（細胞傷害性T細胞）に対する抗体をマウスに投与することによりそれぞれの細胞集団を体内より除去したマウスを用いて、KM871-hIL-2の抗腫瘍効果のメカニズム解析を行った。実施例3の3項(1)のb.で得られたGD3発現B16細胞B16・29-10を 5×10^6 個/mlでPBSに懸濁し、C57 BL/6マウス（雄、7週齢、日本チャールスリバー）の尾静脈より100 μ l注入した。さらに腫瘍移植当日（第0日）より1日1回、5日間連続（第0日～第4日）でKM871-hIL-2を24 μ g/日で尾静脈投与した。同時に対象群としてKM871-hIL-2非投与群も設定した。また、抗マウスNK1.1抗体、抗マウスCD4抗体および抗マウスCD8抗体をそれぞれ0.5mg/日で3回（第-3日、第1日、第3日）腹腔内投与したマウスについてもそれぞれ上記の通りKM871-hIL-2投与群および非投与群を設定した。腫瘍移植後5日目に脾臓を摘出し、実施例3の4項(1)に記載の方法で細胞障害活性を測定した。ただしアッセイ時のKM871濃度は10 μ g/mlに固定し、アッセイ時間は4時間とした。結果を図47に示す。図47に示す通り、本モデル動物におけるKM871-hIL-2の抗腫瘍効果の主要なエフェクター細胞はNK細胞であることが明らかになった。

(4) In vivo depletion 法を用いた抗腫瘍効果のエフェクター細胞解析 (in vivo 抗腫瘍効果)

下記に示す方法を用い、抗腫瘍免疫におけるIL-2応答性のエフェクター細胞であるNK細胞、CD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）、CD8陽性T細胞（細胞傷害性T細胞）に対する抗体をマウスに投与することによりそれぞれの細胞集団を体内より除去したマウスを用いて、KM871-hIL-2の抗腫瘍効果のメカニズム解析を行った。実施例3の3項(1)のb.で得られたGD3発現B16細胞B16・29-10を 5×10^6 個/mlでPBSに懸濁し、C57 BL/6マウス（雄、7週齢、日本チャールスリバー）

の尾静脈より 100 μ l 注入した。さらに腫瘍移植当日(第 0 日)より 1 日 1 回、5 日間連続(第 0 日～第 4 日)で KM871-hIL-2 を 24 μ g/日で尾静脈投与した。同時に対象群として KM871-hIL-2 非投与群も設定した。また、抗マウス NK1.1 抗体、抗マウス CD4 抗体および抗マウス CD8 抗体をそれぞれ 0.5mg/日で 4 回(第 -3 日、第 1 日、第 3 日、第 7 日)腹腔内投与したマウスについてもそれぞれ上記の通り KM871-hIL-2 投与群および非投与群を設定した。腫瘍移植後 15 日目に肺を摘出し、表面の黒色の転移巣を肉眼で計数した結果を第 16 表および図 48 に示す。

第 16 表

投与	除去	転移巣の数(個)								平均値 (個)	転移阻 害率 (%)
非投与	なし	302	274	269	234	177	176	173		229.3	0.0
	NK細胞	443	430	389	380	373	361	359		390.7	0.0
	CD4+T細胞	291	271	218	211	197	176	115	112	198.9	0.0
	CD8+T細胞	266	226	191	191	182	144	73		181.9	0.0
KW-2871- hIL-2 24 μ g	なし	77	54	46	46	36				51.8	77.4
	NK細胞	422	384	358	356	352				374.4	4.2
	CD4+T細胞	164	134	103	95	47				108.6	45.4
	CD8+T細胞	88	67	53	35	21				52.8	71.0

第 16 表および図 48 に示す通り、本モデル動物において KM871-hIL-2 の抗腫瘍効果における主要なエフェクター細胞は NK 細胞であることが明らかになった。また、CD4 陽性 T 細胞の除去により抗腫瘍効果の部分的な抑制が見られることから、CD4 陽性 T 細胞が NK 細胞を活性化し、間接的に KM871-hIL-2 の抗腫瘍効果に参与している可能性が示唆された。

産業上の利用可能性

本発明により、GD3 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体またはその抗体断片およびガングリオシド GD3 に対する抗体またはその抗体断片の誘導体が提供される。

「配列表フリーテキスト」

配列番号 9－人工配列の説明：合成DNAにより得られたアミノ酸配列

配列番号 10－人工配列の説明：合成DNAにより得られたアミノ酸配列

配列番号 11－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 12－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 13－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 14－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 15－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 16－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 17－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 18－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 19－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 20－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 21－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 22－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 23－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 24－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 25－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 26－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 27－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 28－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 29－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 30－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 31－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 32－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 33－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 34－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 35－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 36－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 37－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 38－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 39－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 40－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 41－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 42－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 43－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 44－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 45－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 46－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 47－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 48－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 49－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 50－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 51－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 52－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 53－人工配列の説明：合成DNA合成DNAにより得られたアミノ酸配列

配列番号 54－人工配列の説明：合成DNA合成DNAにより得られたアミノ酸配列

配列番号 57－人工配列の説明：合成DNA合成DNAにより得られたアミノ酸配列

請 求 の 範 囲

1 ガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体またはその抗体断片と、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。

2 ガングリオシドGD3に特異的に反応するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる抗体である、請求項1記載の抗体の誘導体。

3 モノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む請求項1または2記載の抗体の誘導体。

4 モノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む請求項1または2記載の抗体の誘導体。

5 モノクローナル抗体の重鎖（H鎖）可変領域（V領域）のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、軽鎖（L鎖）V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む請求項1または2記載の抗体の誘導体。

6 ハイブリドーマが産生する抗体がKM641（FERM BP-3116）である、請求項2記載の抗体の誘導体。

7 ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である、請求項2記載の抗体の誘導体。

8 ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含む、請求項7記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

9 ヒト型キメラ抗体が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域（C領域）およびL鎖C領域とからなる、請求項7記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

10 H鎖V領域が配列番号55で示されるアミノ酸配列を含む、請求項8または

9 記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

1 1 L鎖V領域が配列番号 5 6 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 または 9 記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

1 2 H鎖V領域が配列番号 5 5 で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号 5 6 で示されるアミノ酸配列を含む請求項 8 または 9 記載のヒト型キメラ抗体の誘導体。

1 3 H鎖V領域が配列番号 5 5 で示されるアミノ酸配列を含み、L鎖V領域が配列番号 5 6 で示されるアミノ酸配列を含む請求項 8 または 9 記載のヒト型キメラ抗体KM871の誘導体。

1 4 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを含む、請求項 7 記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

1 5 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、請求項 7 記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

1 6 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域とからなるヒト型CDR移植抗体である請求項 7 記載の抗体の誘導体。

1 7 抗体のH鎖V領域のCDR 1、CDR2およびCDR 3 がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

1 8 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

1 9 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

2 0 抗体のH鎖V領域が配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を含む請求項 1 4 ~

1 6 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

2 1 抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

2 2 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体の誘導体。

2 3 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8871の誘導体。

2 4 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (scFv)、ジスルフィド安定化V領域断片 (dsFv) およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項 1 記載の抗体断片の誘導体。

2 5 抗体断片が、ガングリオシドGD3に対するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 4 記載の抗体断片の誘導体。

2 6 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号 5 5 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 4 記載の抗体断片の誘導体。

2 7 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号 5 6 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 4 記載の抗体断片の誘導体。

2 8 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号 5 5、抗体のL鎖V領域が配列番号 5 6 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 4 記載の抗体断片の誘導体。

2 9 抗体断片が、ガングリオシドGD3に対するヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 4 記載の抗体断片の誘導体。

3 0 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 4 記載の抗体断片の誘導体。

3 1 抗体断片が、抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 4 記載の抗体断片の誘導体。

3 2 抗体断片が、抗体のH鎖V領域が配列番号9、抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 4 記載の抗体断片の誘導体。

3 3 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または2 4記載の抗体断片の誘導体。

3 4 抗体断片が、抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または2 4記載の抗体断片の誘導体。

3 5 抗体断片が、抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1または2 4記載の抗体断片の誘導体。

3 6 蛋白質がサイトカインである、請求項1～3 5のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片の誘導体。

3 7 サイトカインがヒトインターロイキン2 (hIL-2) である請求項3 6記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片の誘導体。

3 8 抗体の誘導体が、ヒト型キメラ抗体KM871とhIL-2とからなる請求項3 7記載の抗体の誘導体。

3 9 hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号5 7記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号5 6記載のアミノ酸配列を有する請求項3 8記載の抗体の誘導体。

4 0 抗体の誘導体が、ヒト型CDR移植抗体KM8871とhIL-2とからなる請求項3 7記載の抗体の誘導体。

4 1 hIL-2と結合した抗体のH鎖V領域が配列番号53記載のアミノ酸配列を有し、抗体のL鎖V領域が配列番号54記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載の抗体の誘導体。

4 2 請求項1～4 1のいずれか1項に記載のガングリオシドGD 3に特異的に反応するモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体をコードするDNA。

4 3 請求項4 2記載のDNAを含有する組換えベクター。

4 4 請求項4 3記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

4 5 請求項3 8記載の抗体を生産する形質転換株KM871hIL2 (FERM BP-6918) 。

46 請求項40記載の抗体を生産する形質転換株KM8871hIL2 (FERM BP-6791)。

47 請求項44～46記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項1～41のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体の誘導体またはその抗体断片の誘導体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

48 ガングリオシドGD3に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

49 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを含む、請求項48記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

50 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRとヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFRを含む、請求項48記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

51 ヒト型CDR移植抗体が、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDR、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFR、ならびにヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域とからなる請求項48記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

52 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5で示されるアミノ酸配列を含む、請求項49～51のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

53 抗体のL鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項49～51のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

54 抗体のH鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号3、4および5、L鎖V領域のCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号6、7および8で示されるアミノ酸配列を含む、請求項49～51のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

55 抗体のH鎖V領域が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む、請求項49～51のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

56 抗体のL鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項49

～51のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

57 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項49～51のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

58 抗体のH鎖V領域が配列番号9、L鎖V領域が配列番号54で示されるアミノ酸配列を含む、請求項49～51のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体KM8871またはその抗体断片。

59 請求項48～58のいずれか1項に記載のガングリオシドGD3に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片をコードするDNA。

60 請求項59記載のDNAを含有する組換えベクター。

61 請求項60記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

62 請求項58記載のヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換株KM8871 (FERM BP-6790)。

63 請求項61または62記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項48～58のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片の誘導体を生成蓄積させ、該培養物から該抗体またはその抗体断片を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

64 請求項1～41記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに請求項48～58記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種からなる医薬。

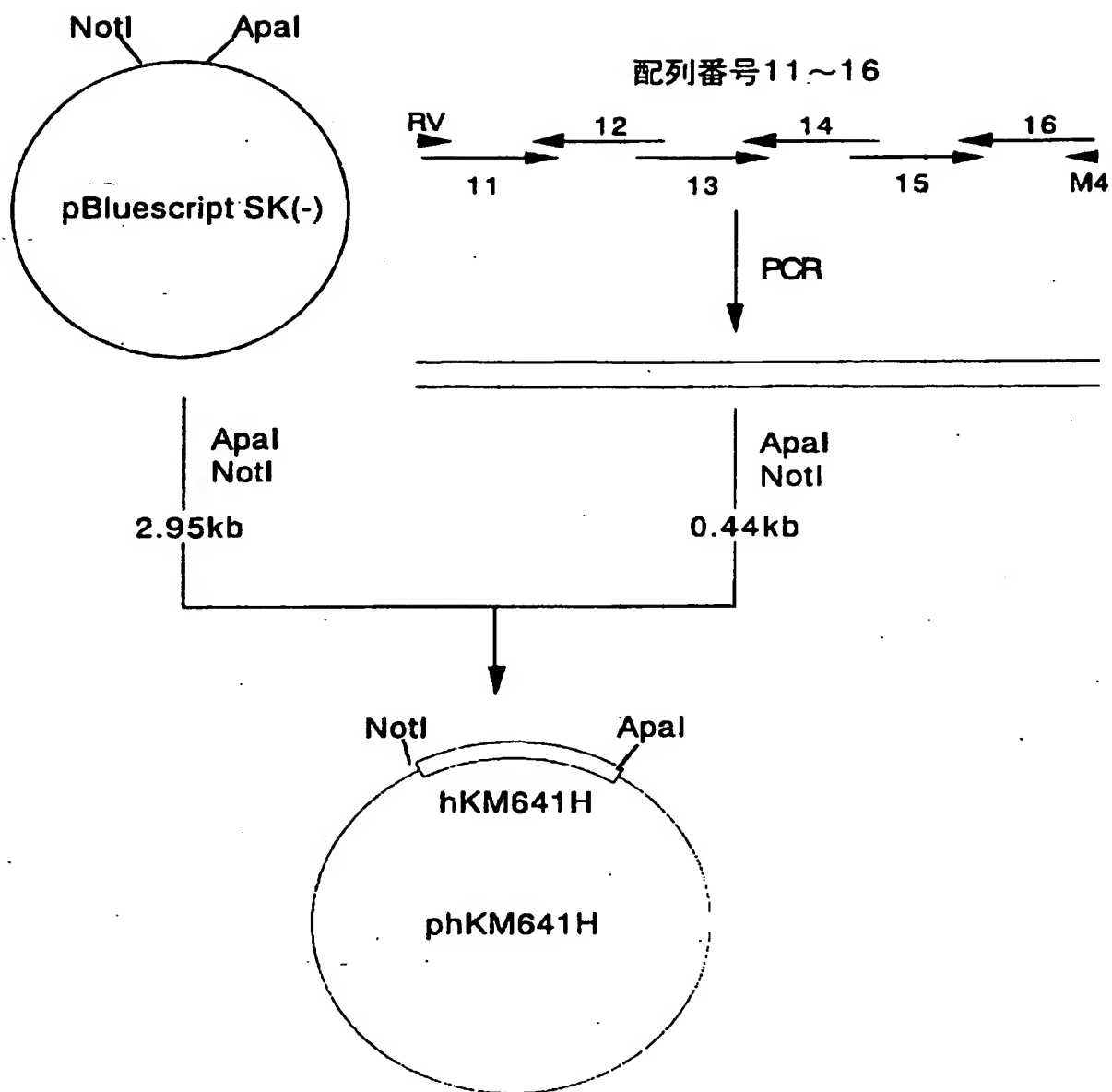
65 請求項1～41記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに請求項48～58記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する癌の治療薬。

66 請求項1～41記載のモノクローナル抗体の誘導体およびその抗体断片の誘導体、ならびに請求項48～58記載のヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する癌の診断薬。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 41

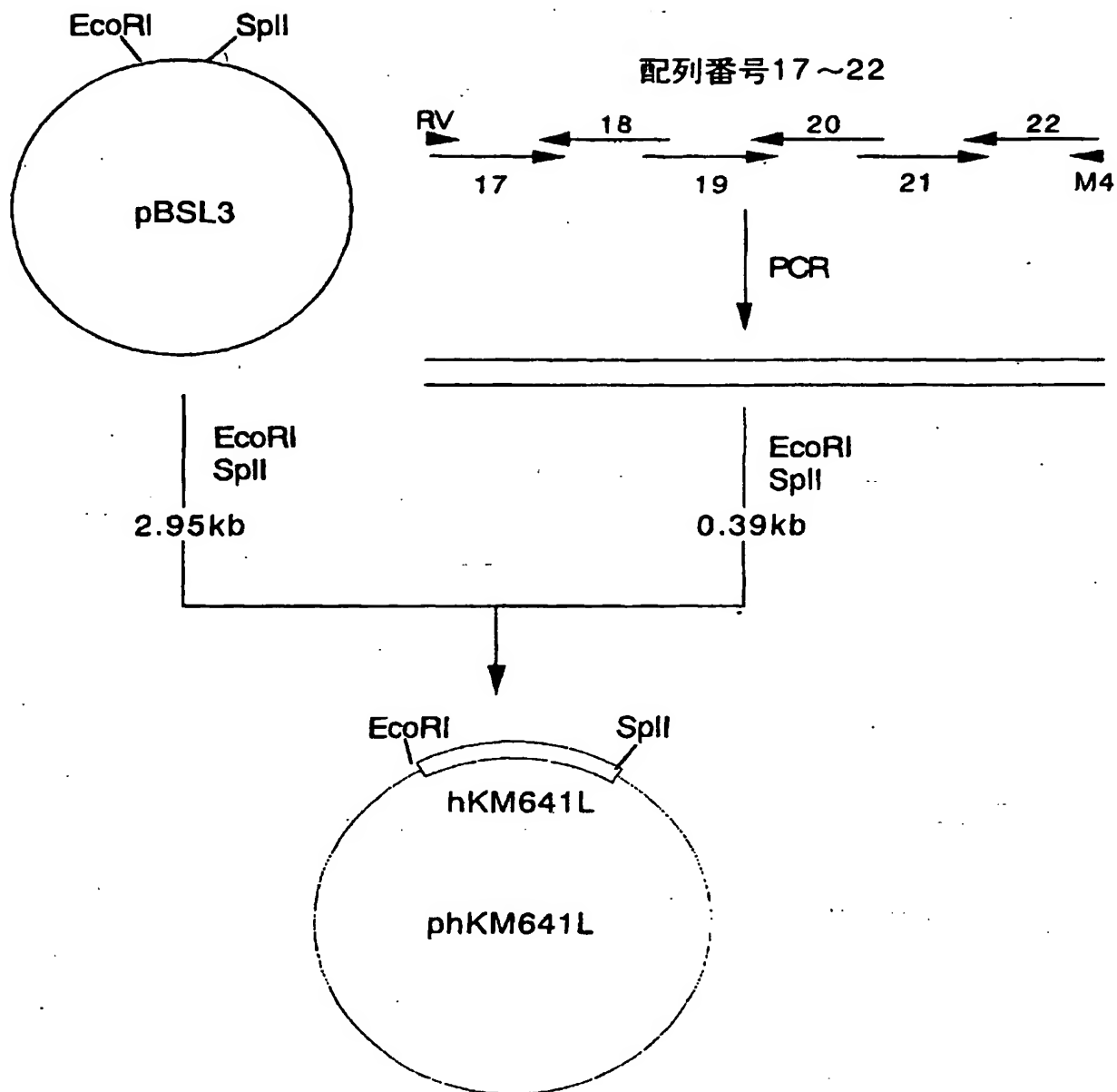
図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 41

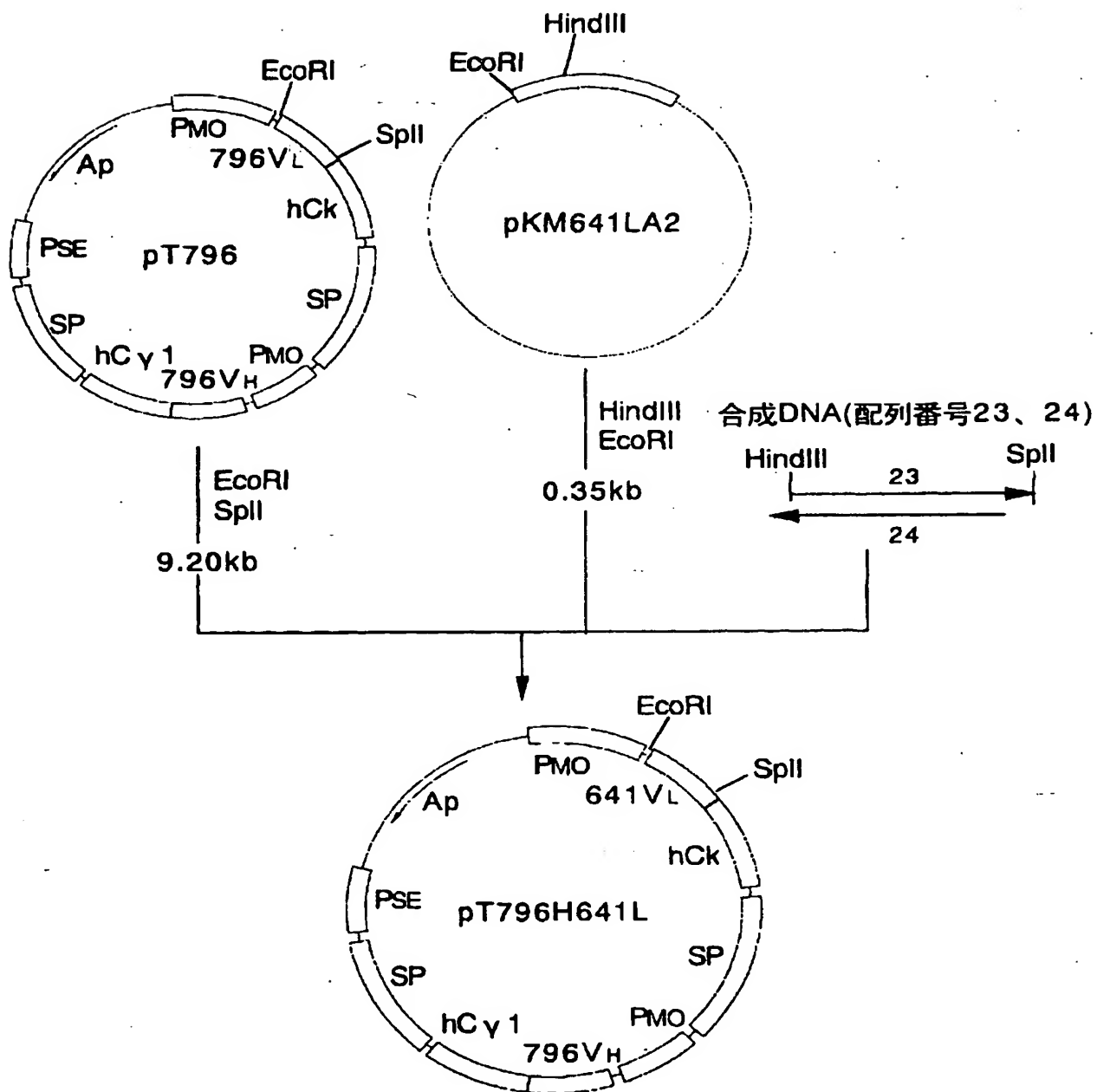
図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 41

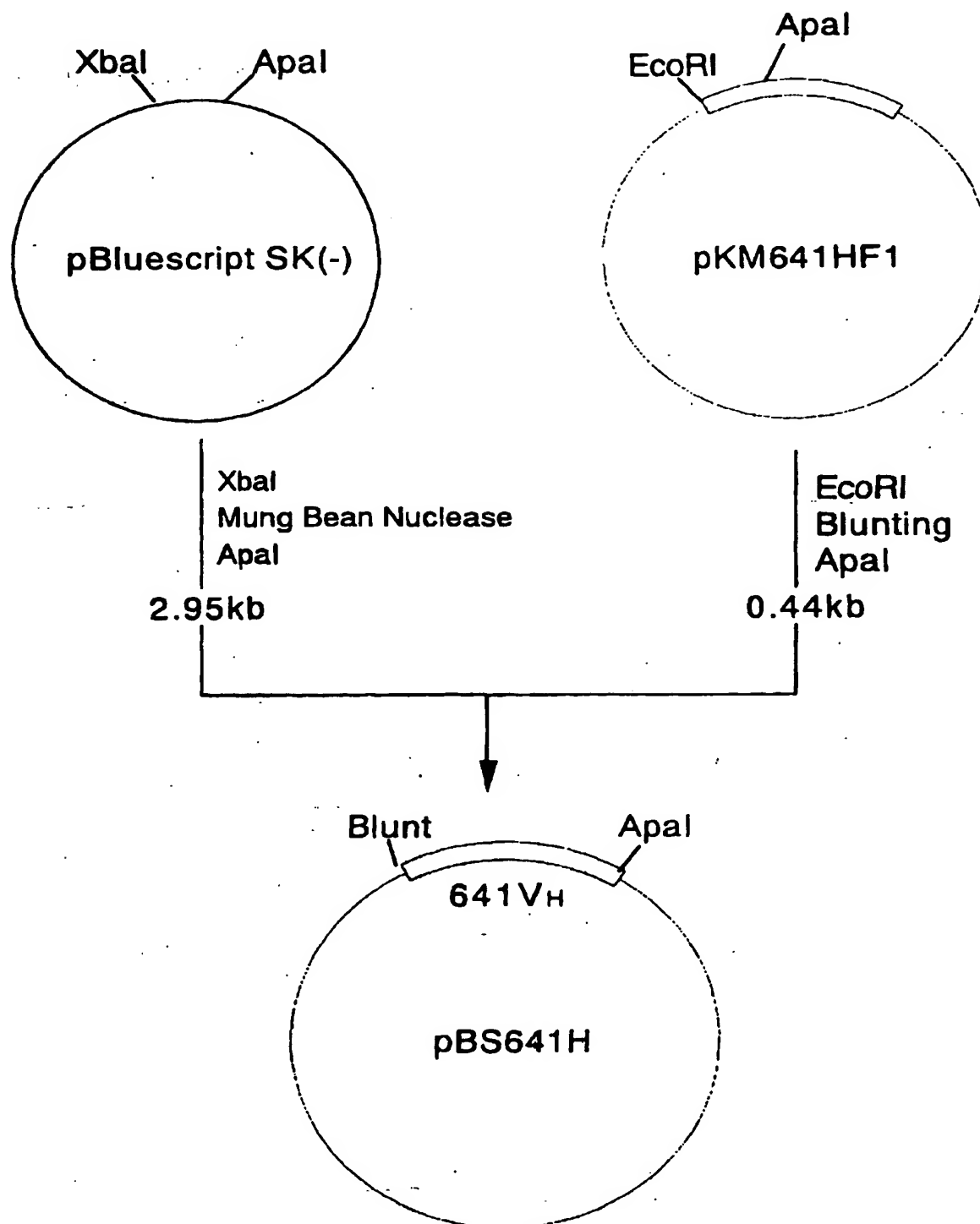
図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 41

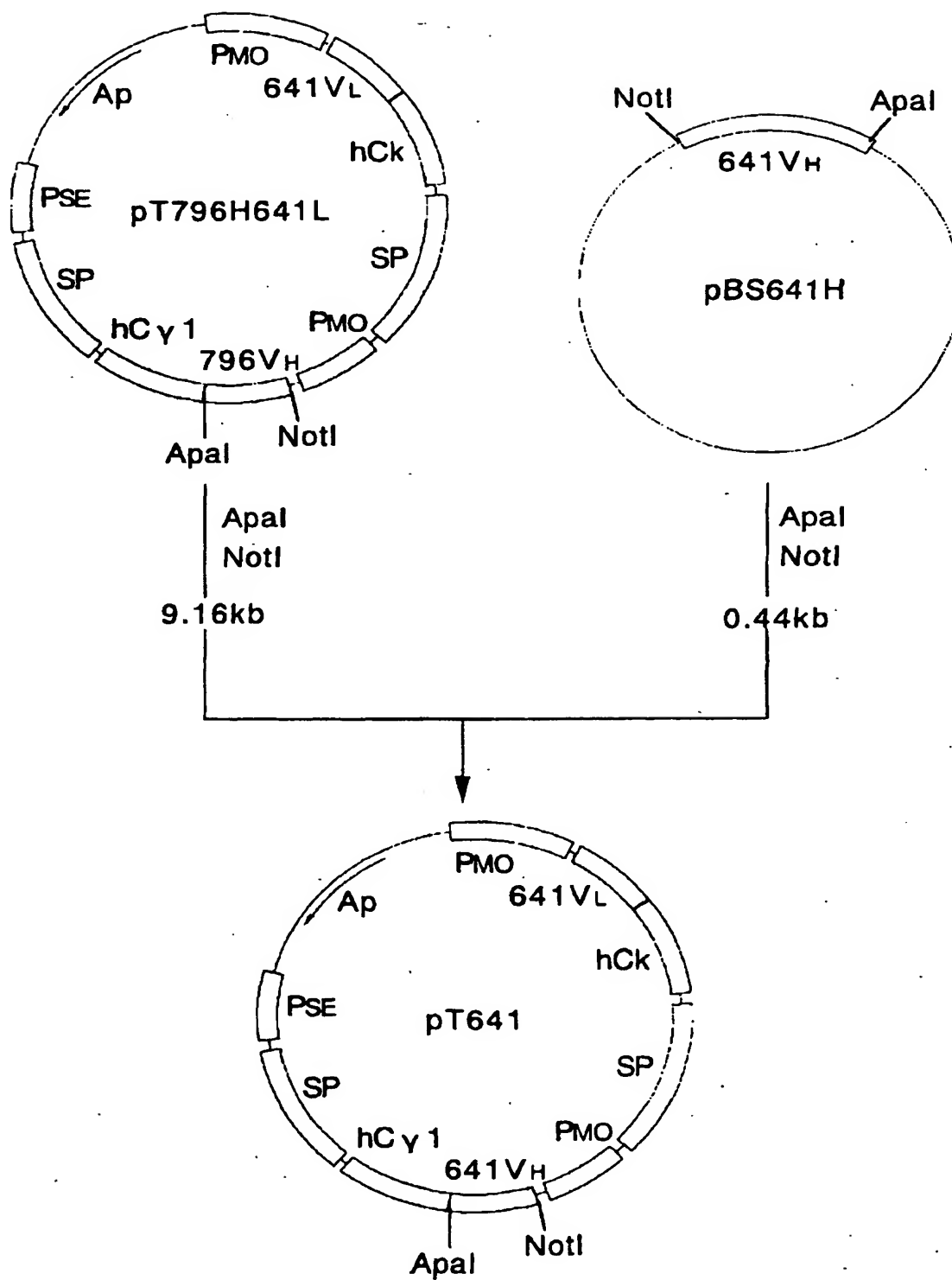
☒ 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 41

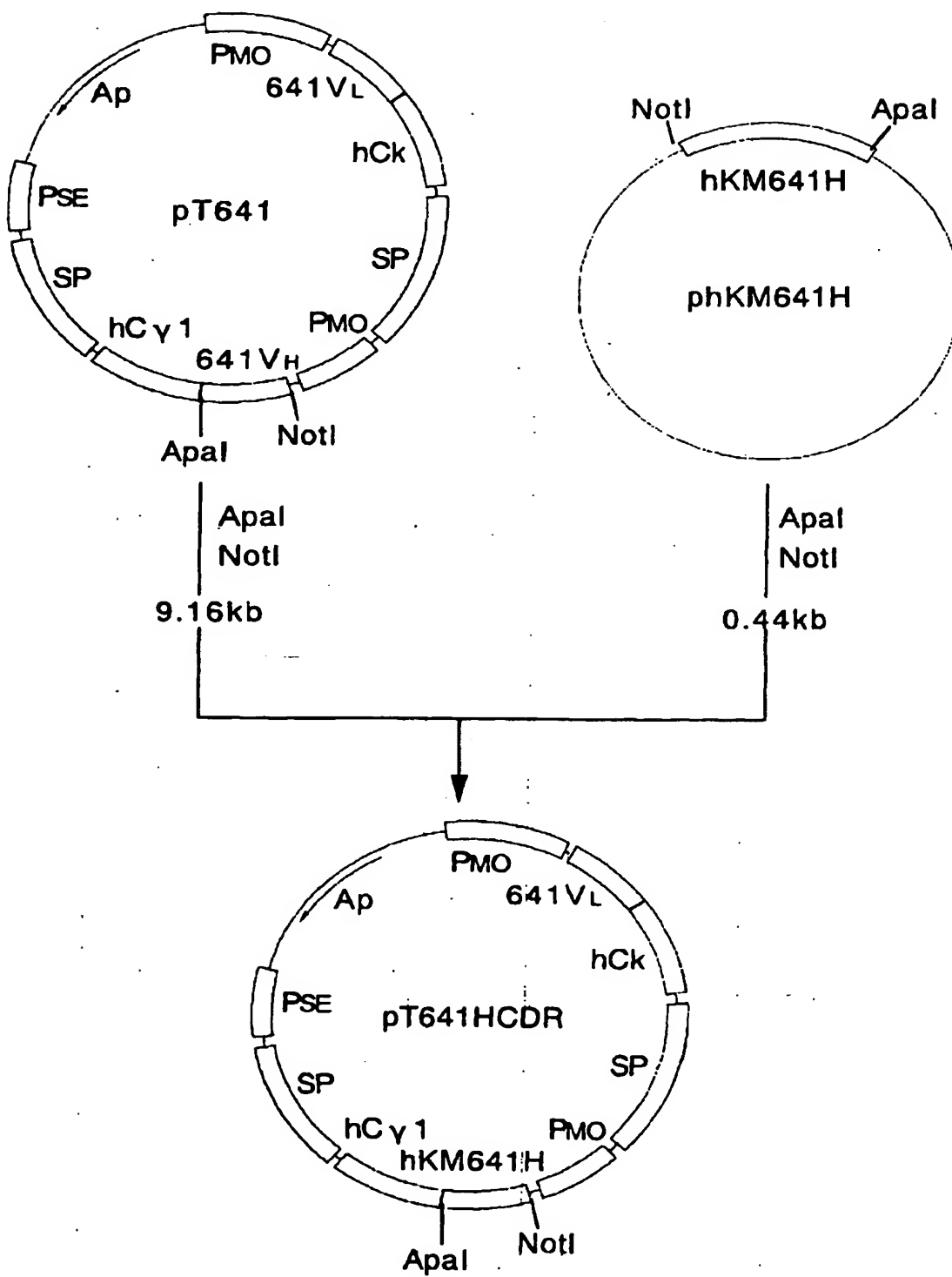
☒ 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 41

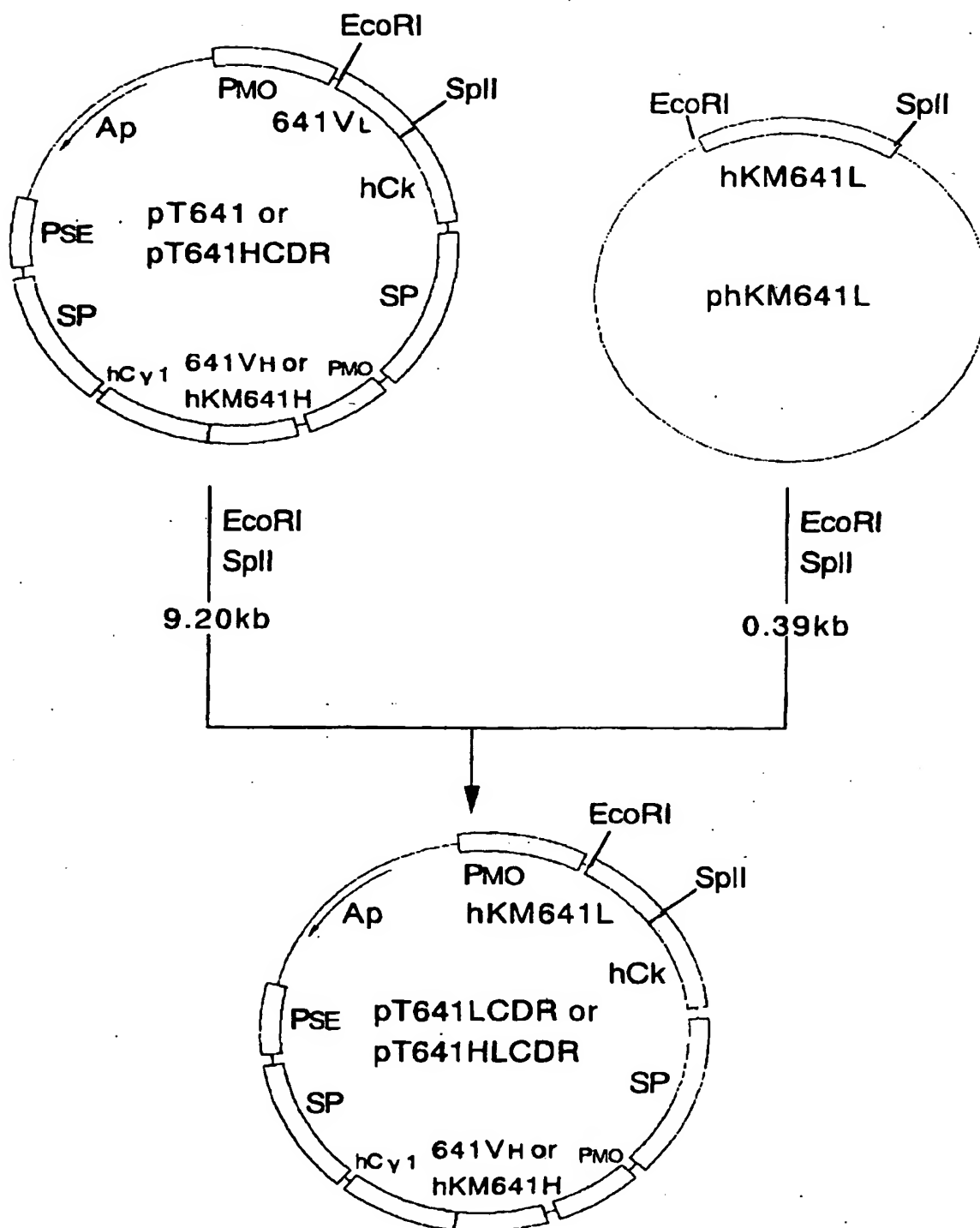
☒ 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

7 / 41

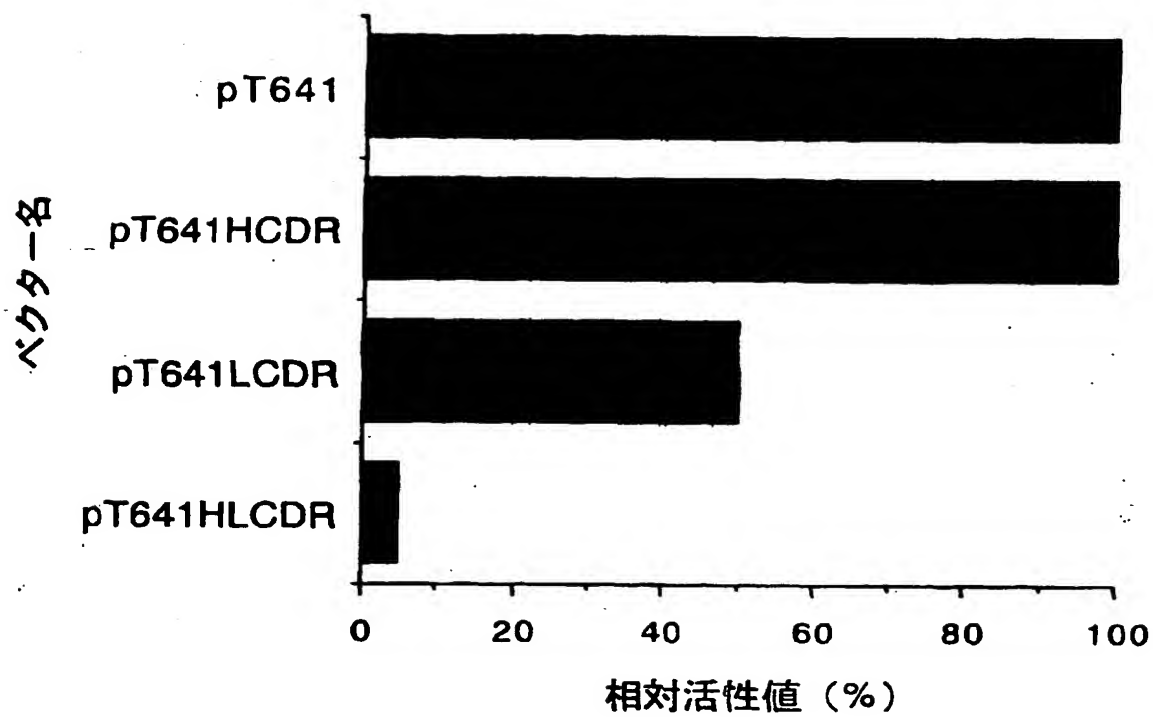
☒ 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

8 / 41

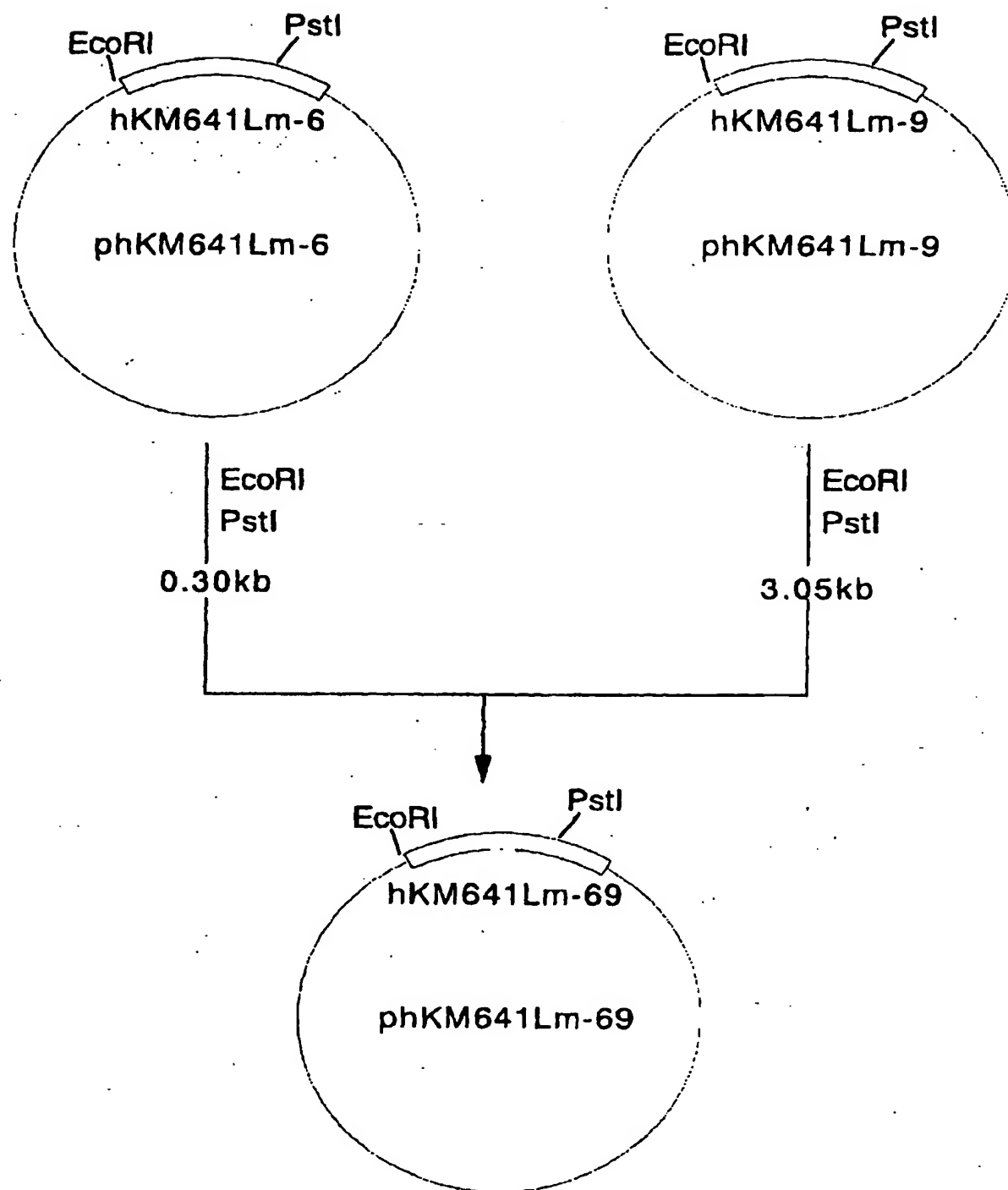
☒ 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

9 / 41

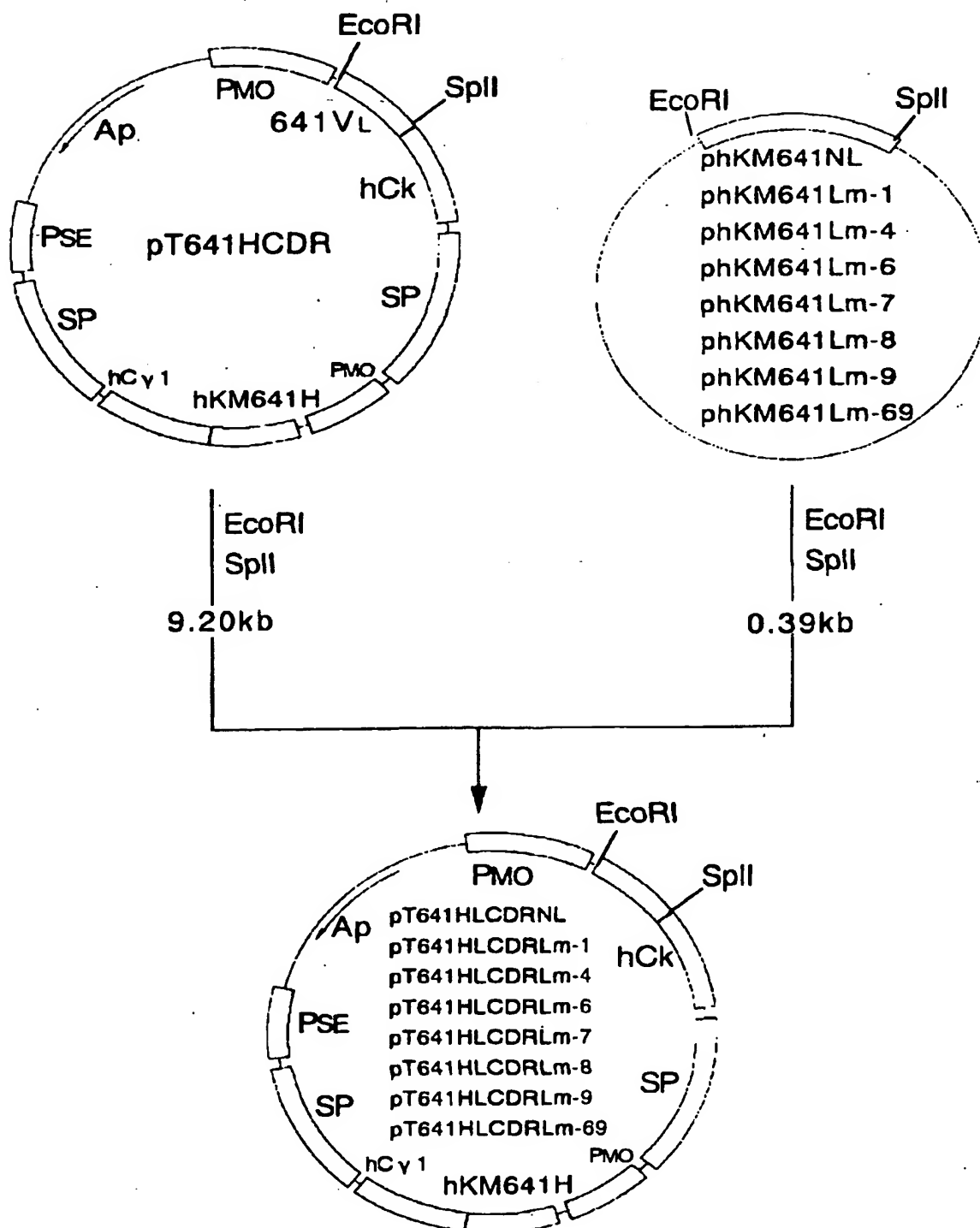
☒ 9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

10 / 41

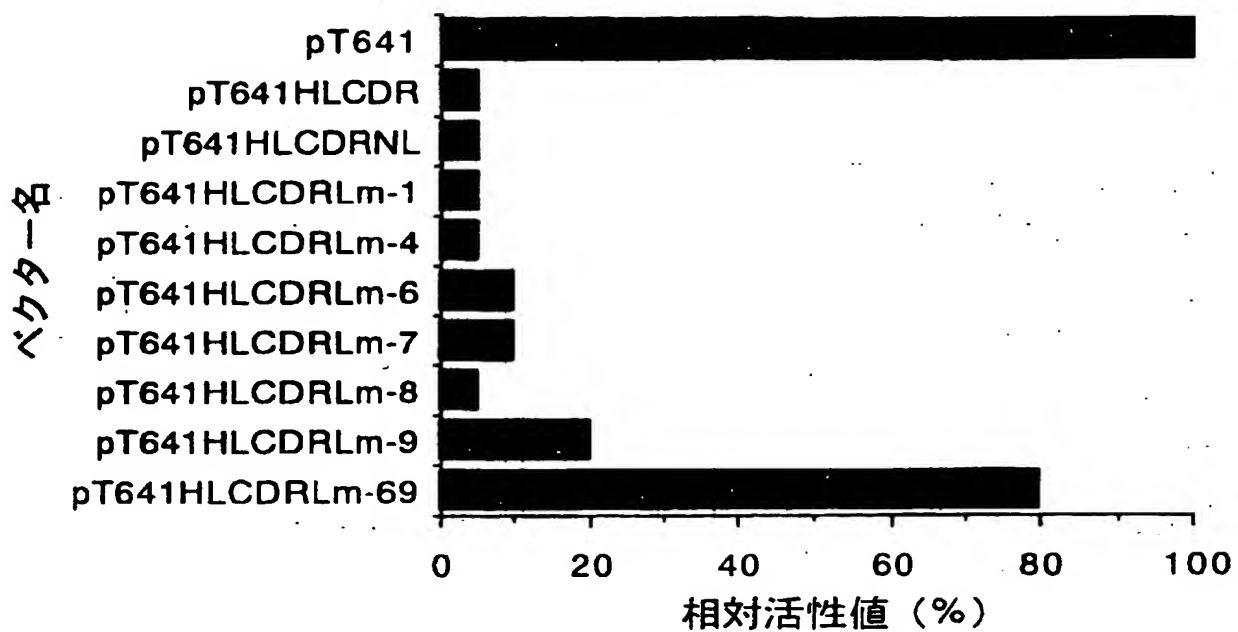
☒ 10



THIS PAGE BLANK (USPTO)

11 / 41

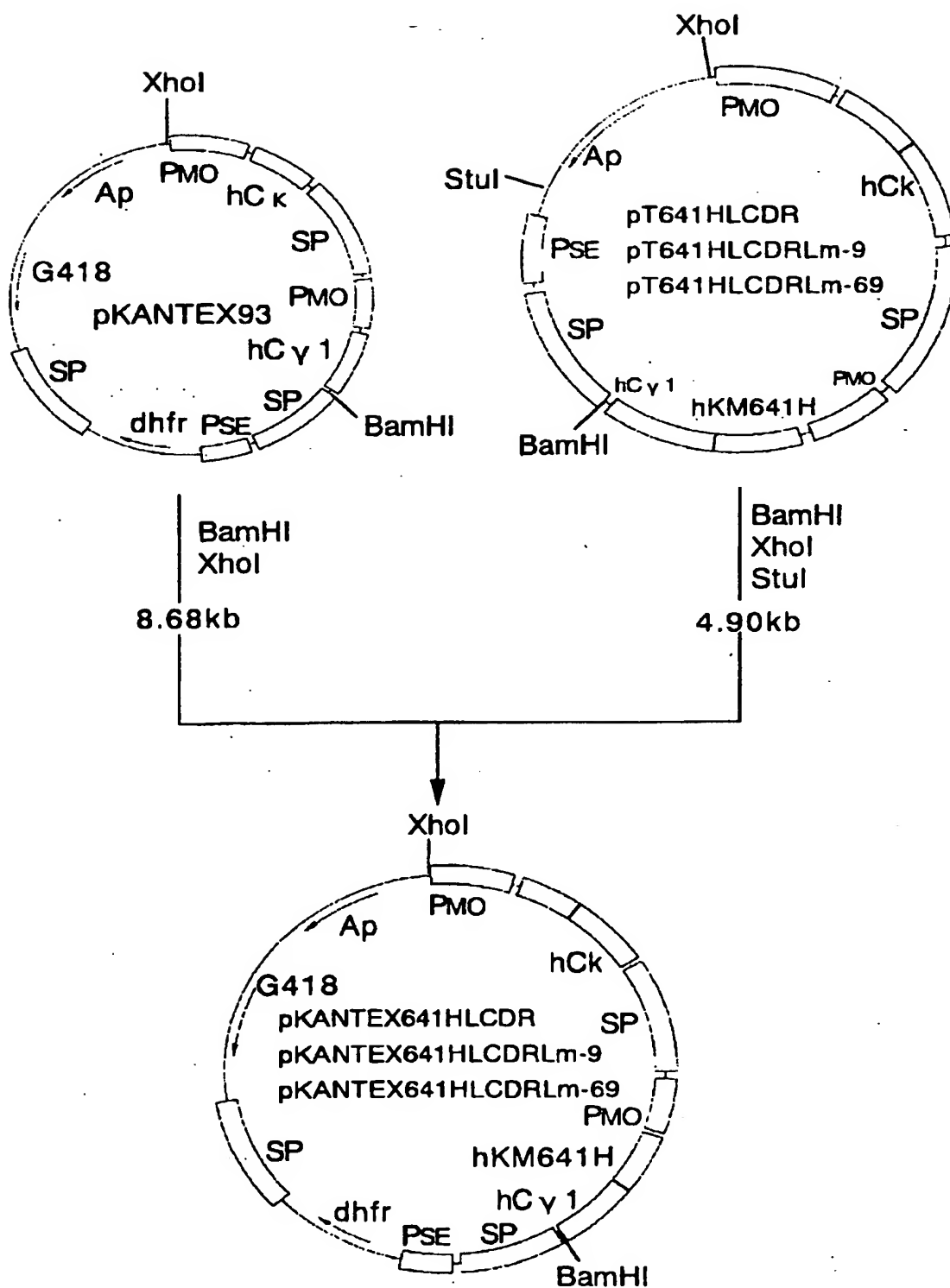
図 11



THIS PAGE BLANK (USPTO)

12 / 41

☒ 1 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 13

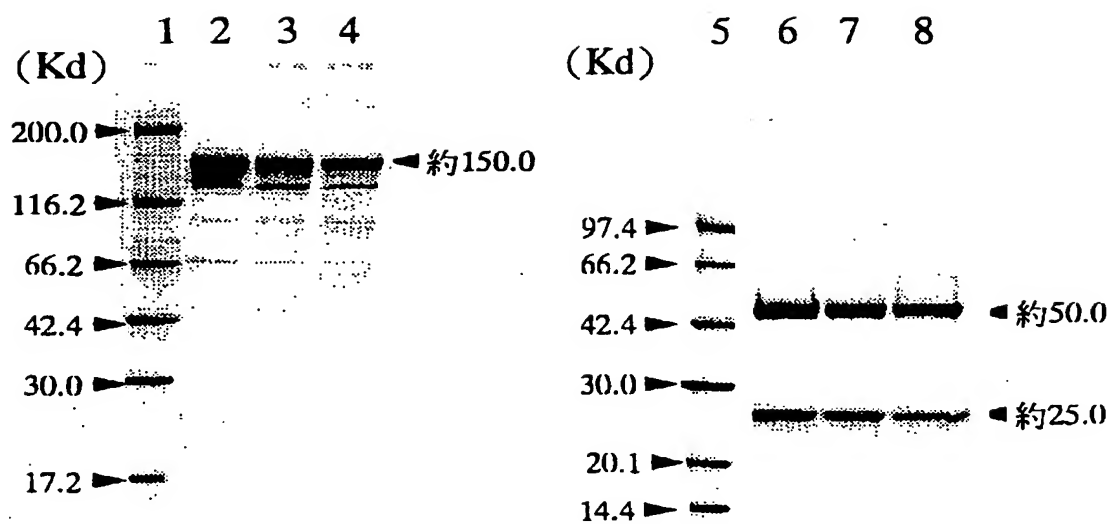
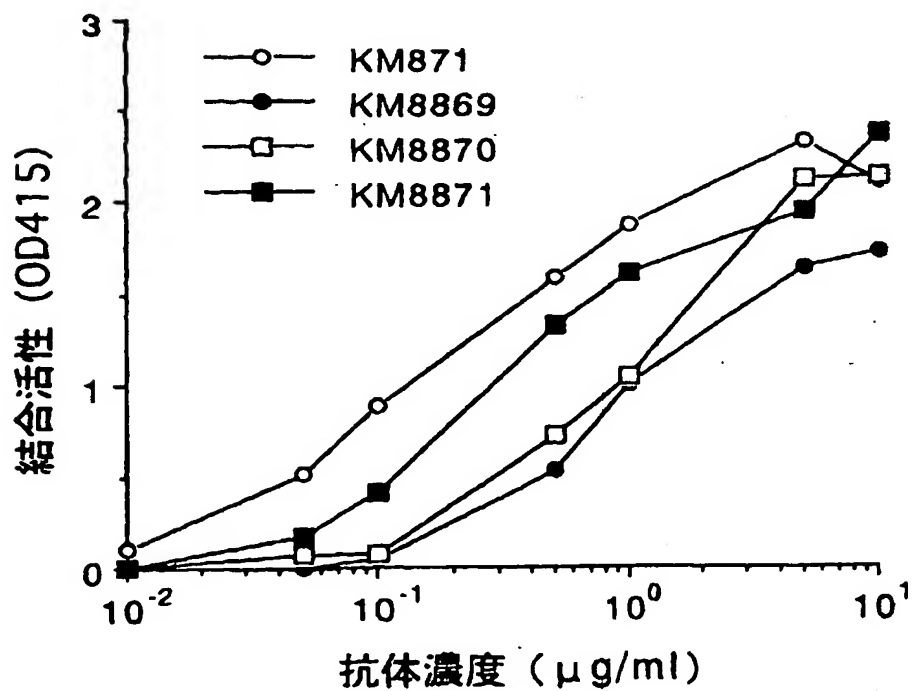


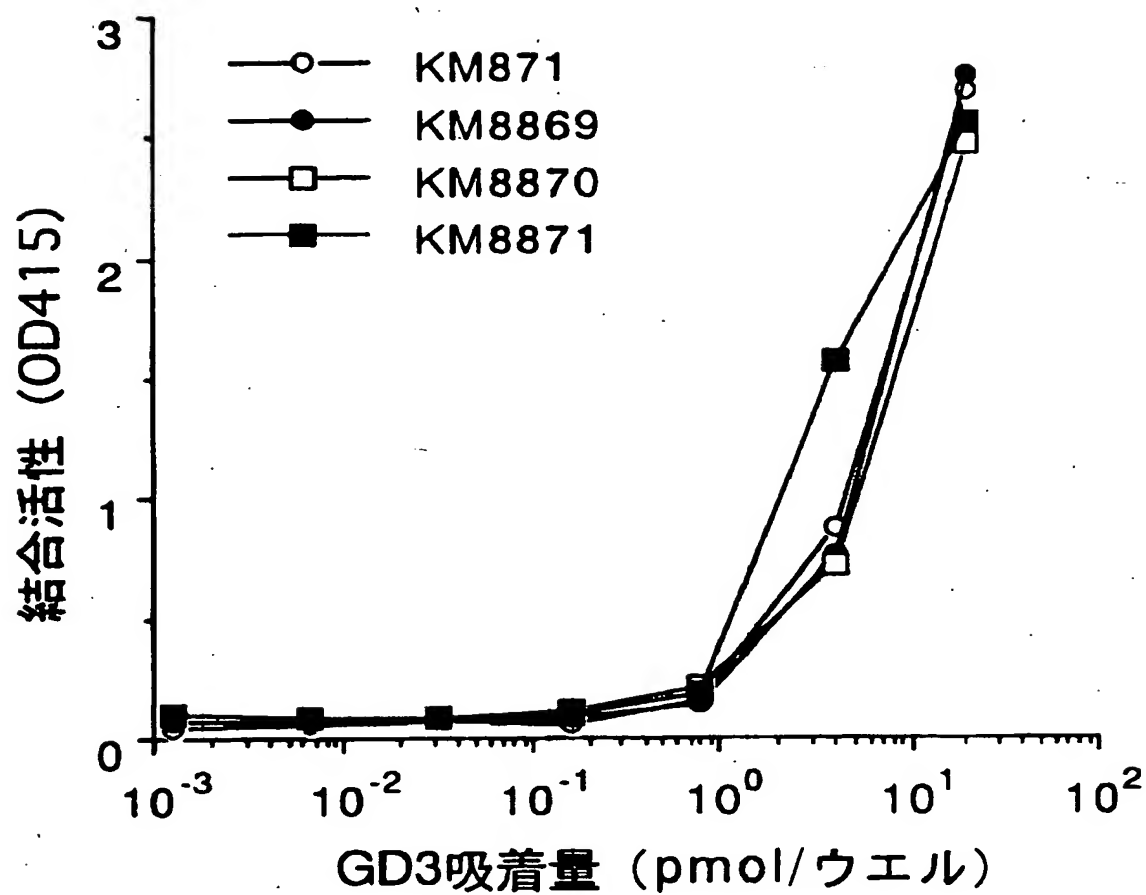
図 14



THIS PAGE BLANK (USPTO)

14 / 41

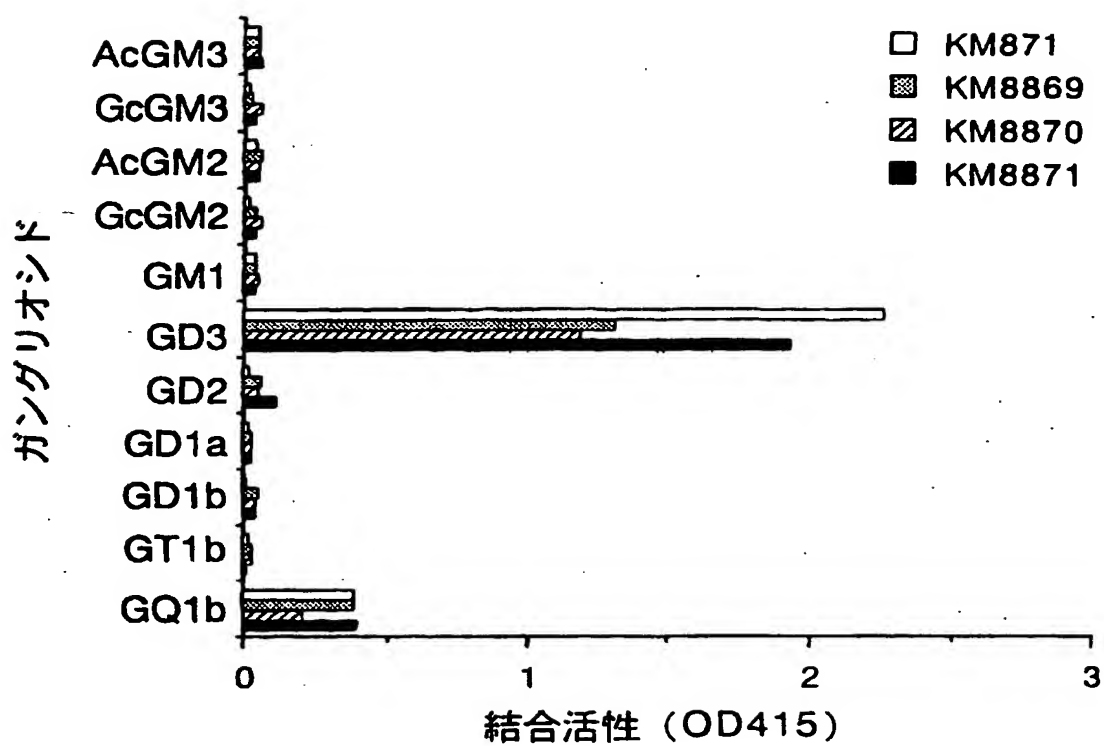
図 15



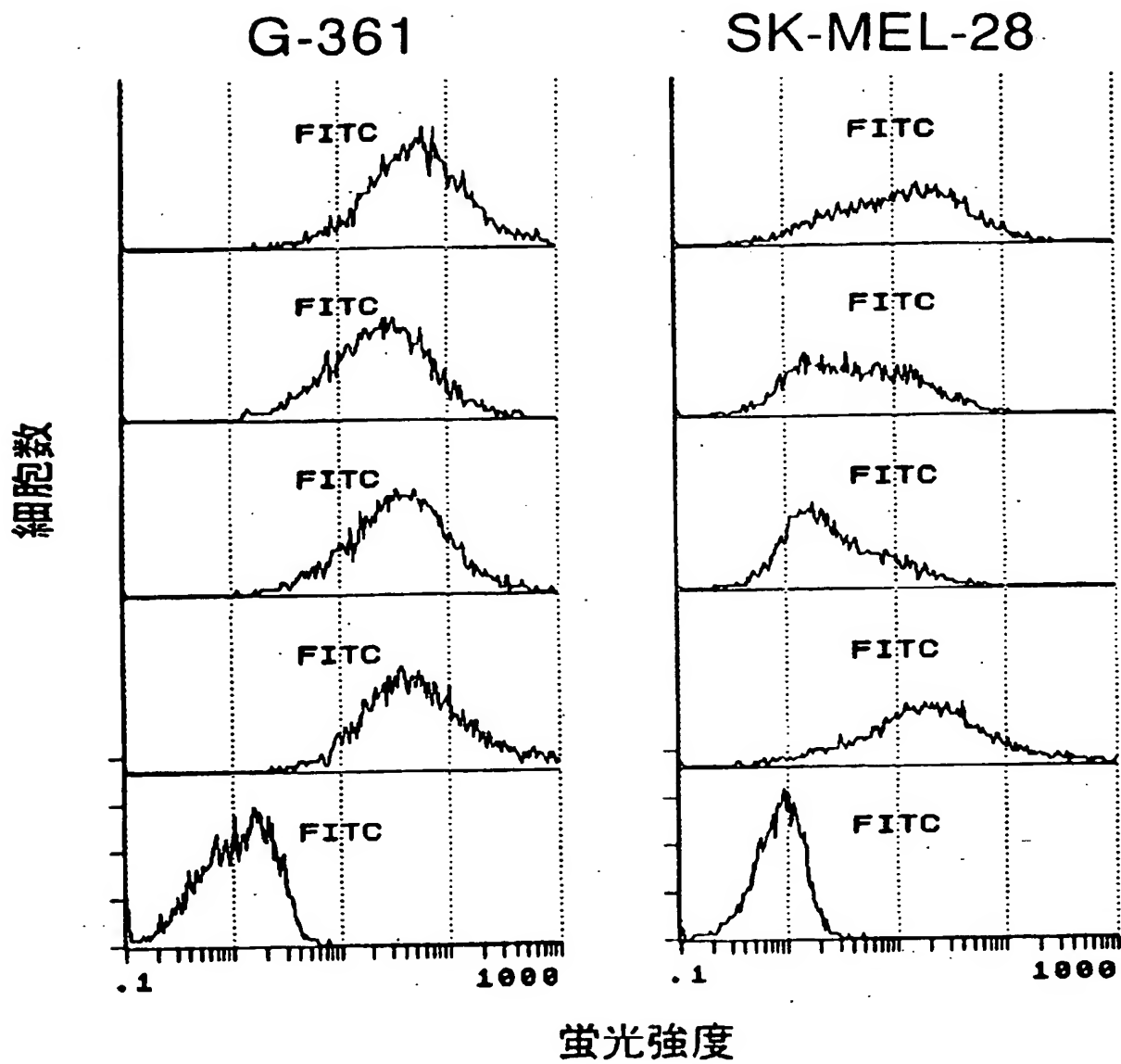
THIS PAGE BLANK (USPTO)

15 / 41

☒ 16



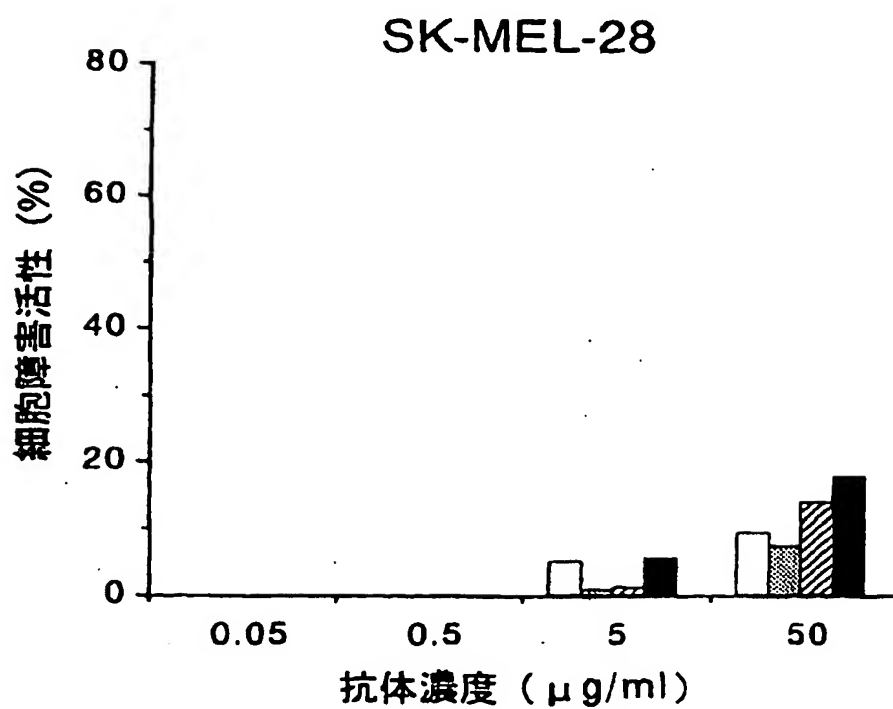
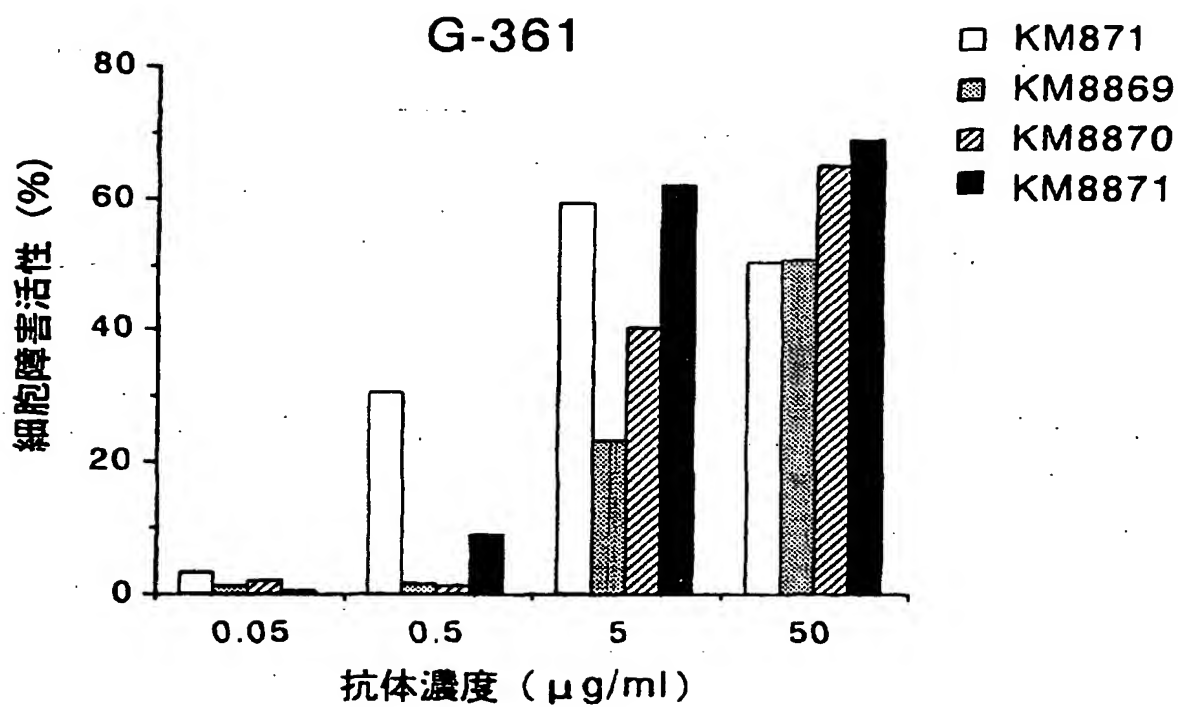
THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

17 / 41

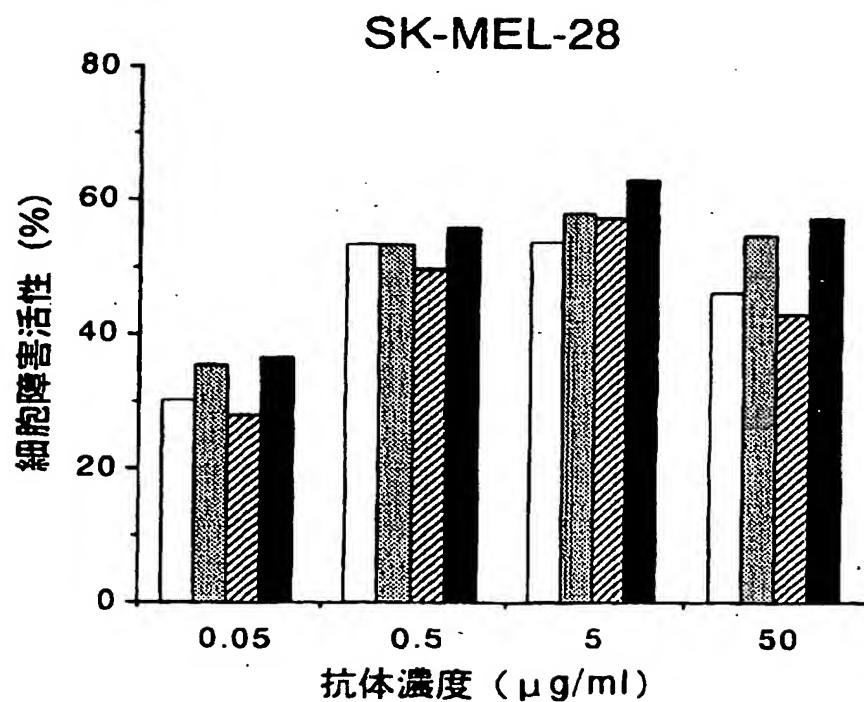
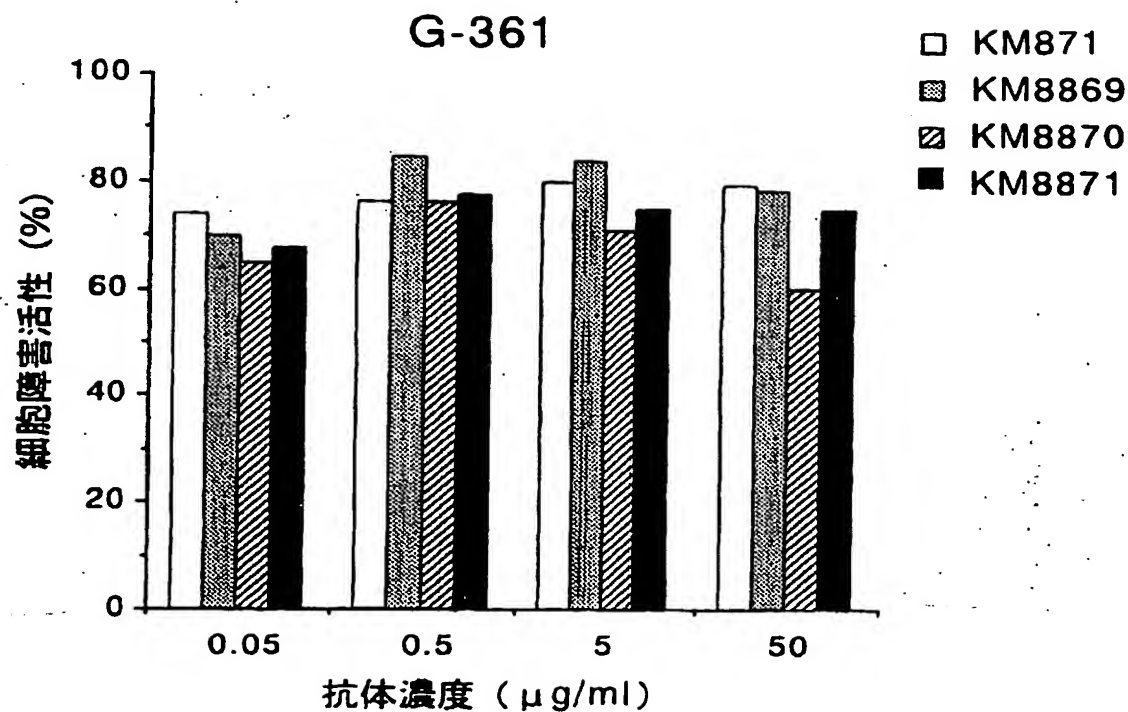
図 18



THIS PAGE BLANK (USPTO)

18 / 41

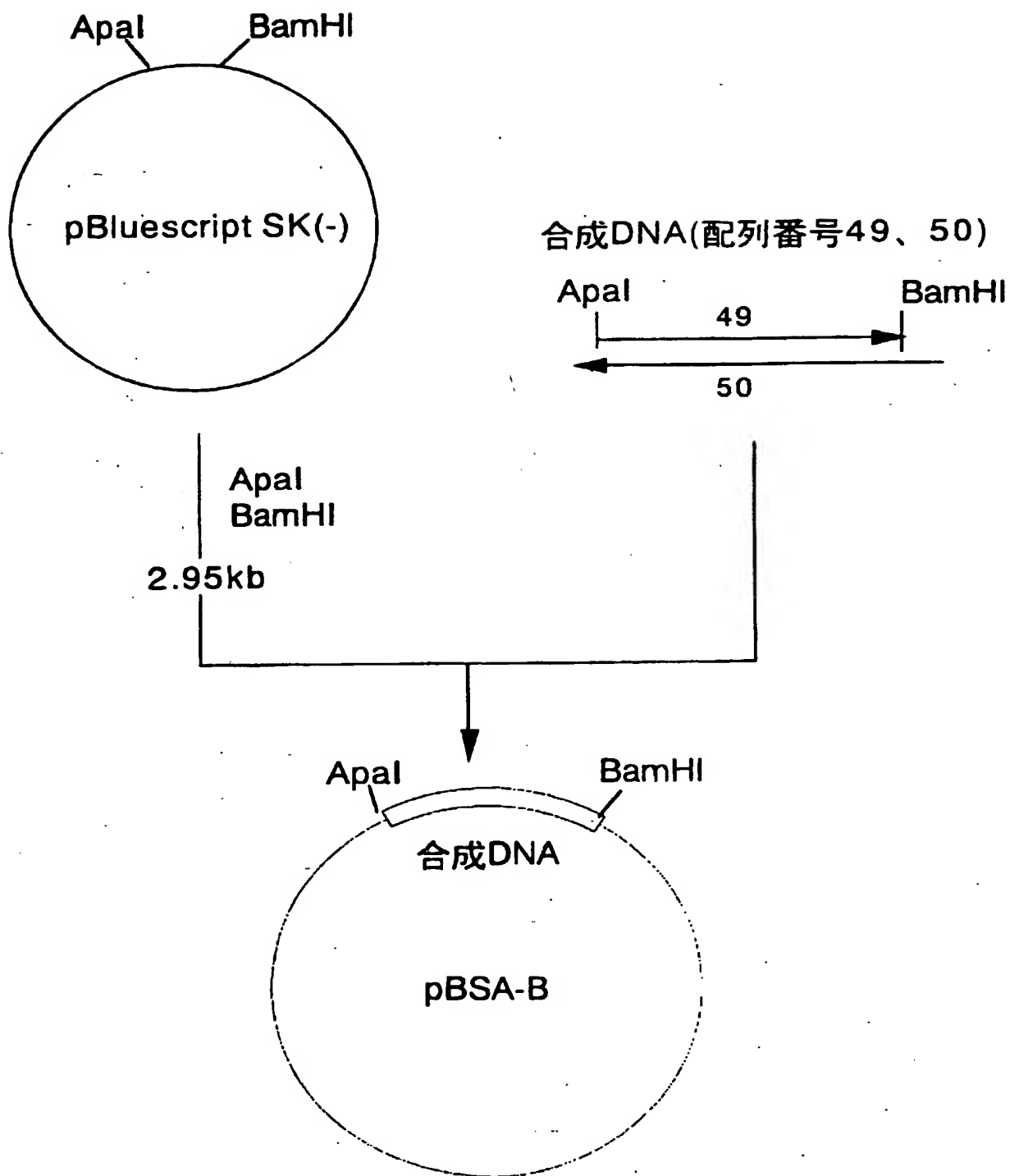
図 19



THIS PAGE BLANK (USPTO)

19 / 41

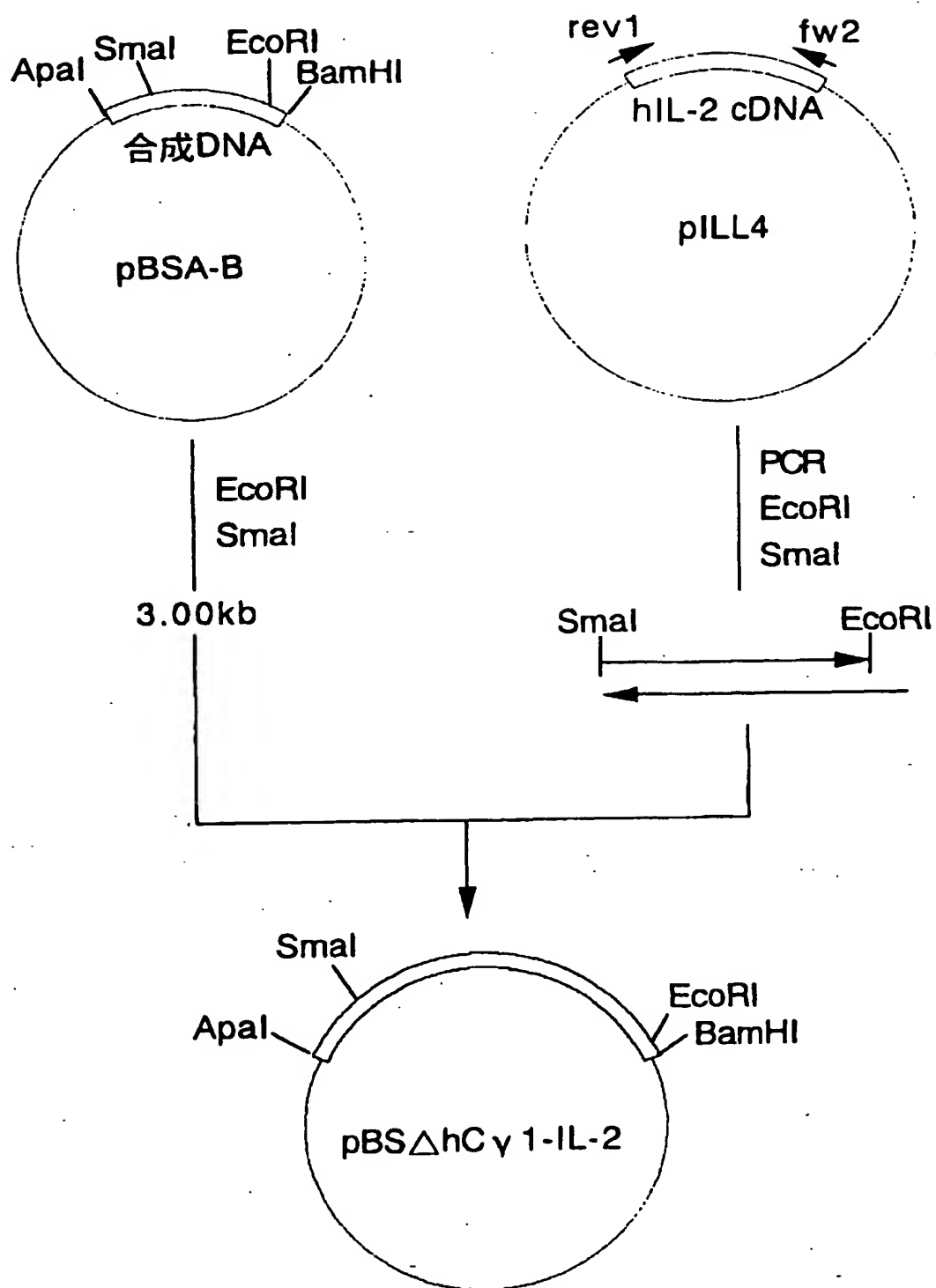
図 20



THIS PAGE BLANK (USPTO)

20 / 41

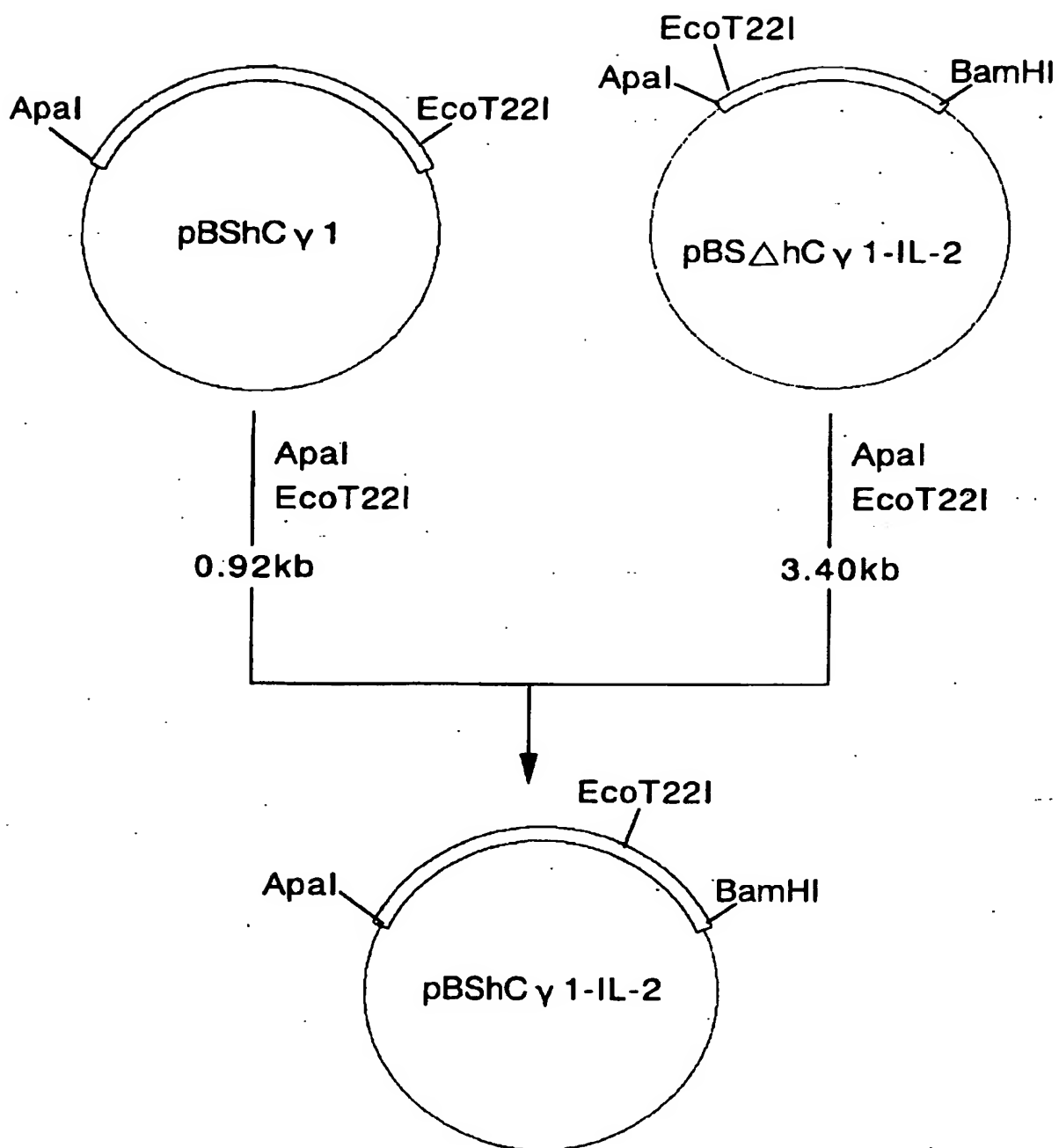
図 21



THIS PAGE BLANK (USPTO)

21 / 41

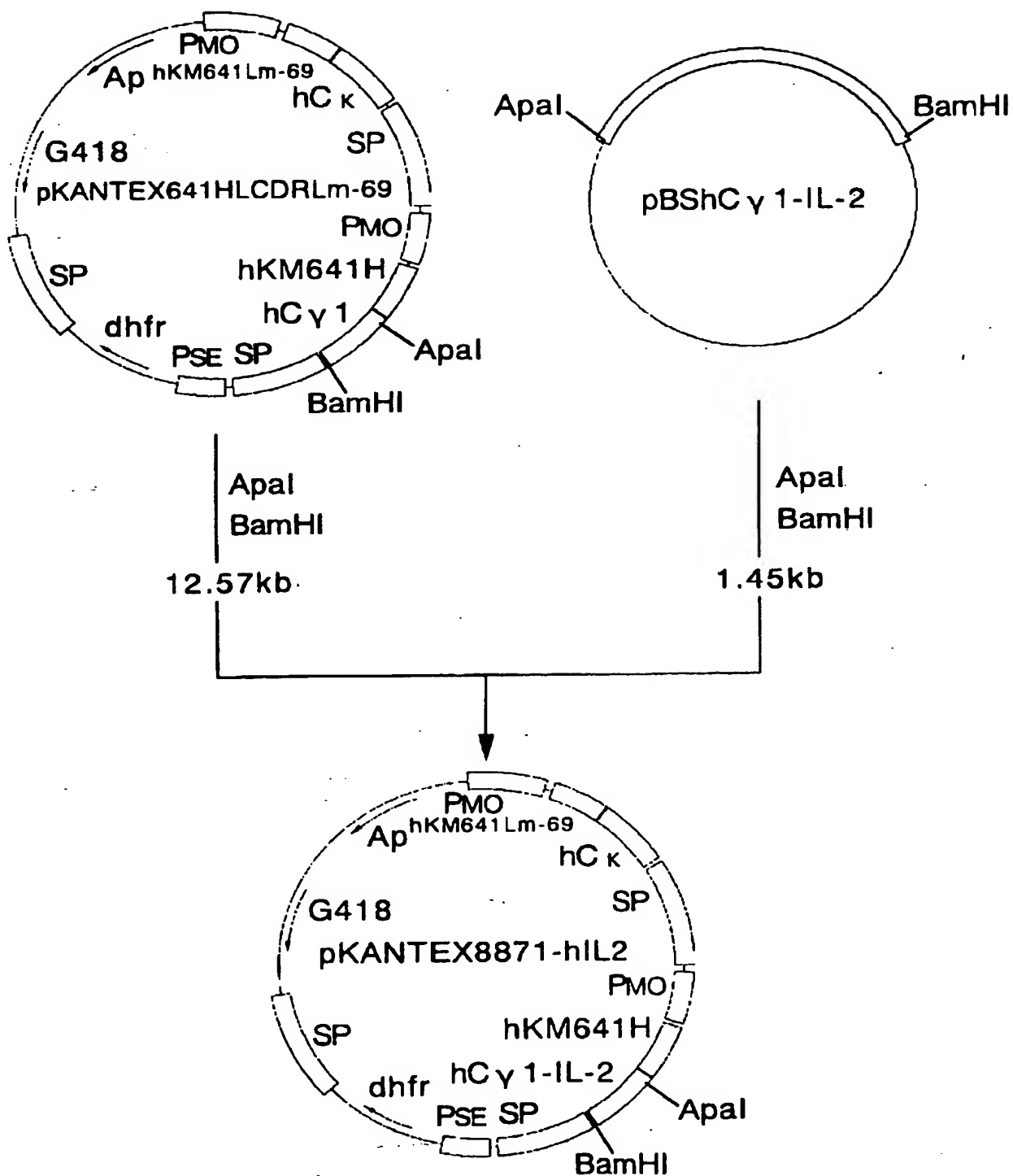
☒ 2 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

22 / 41

☒ 2 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 24

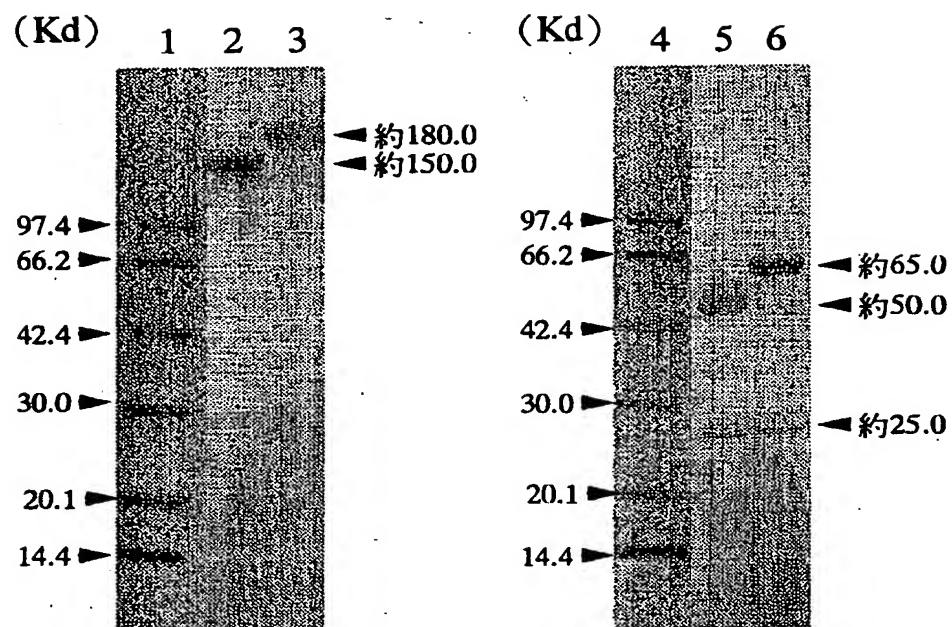
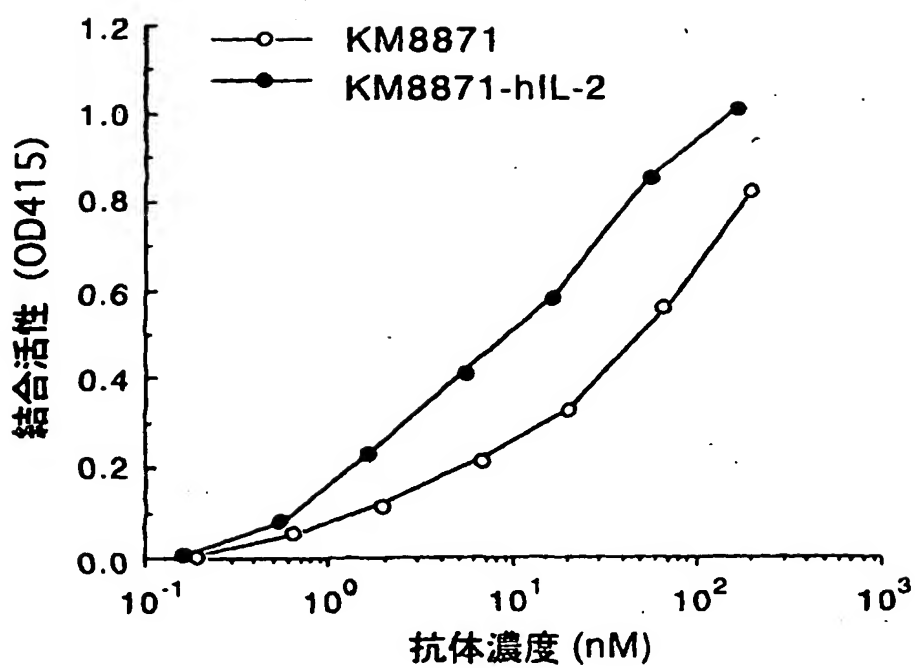


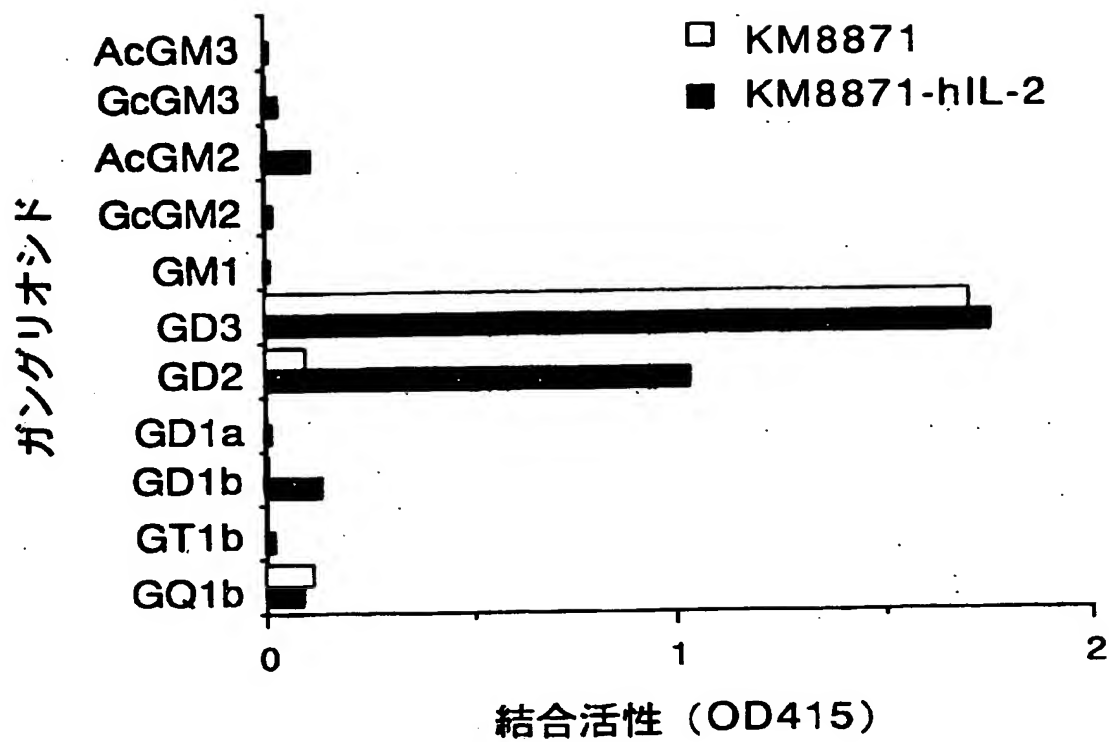
図 25



THIS PAGE BLANK (USPTO)

24 / 41

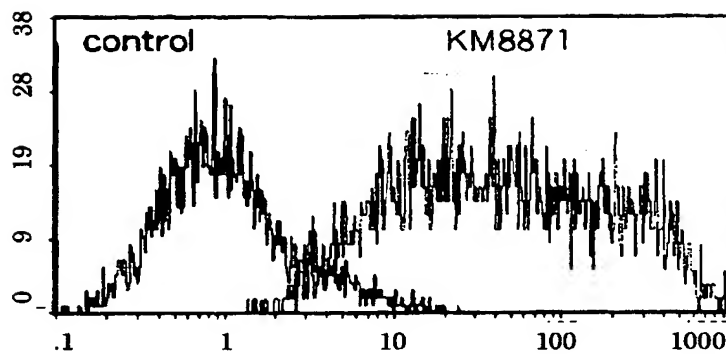
図 26



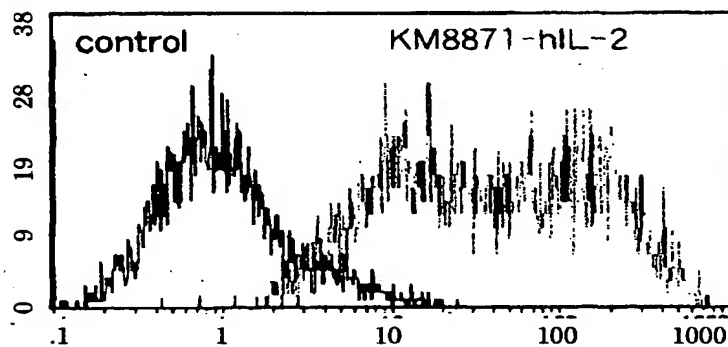
THIS PAGE BLANK (USPTO)

25 / 41

☒ 27

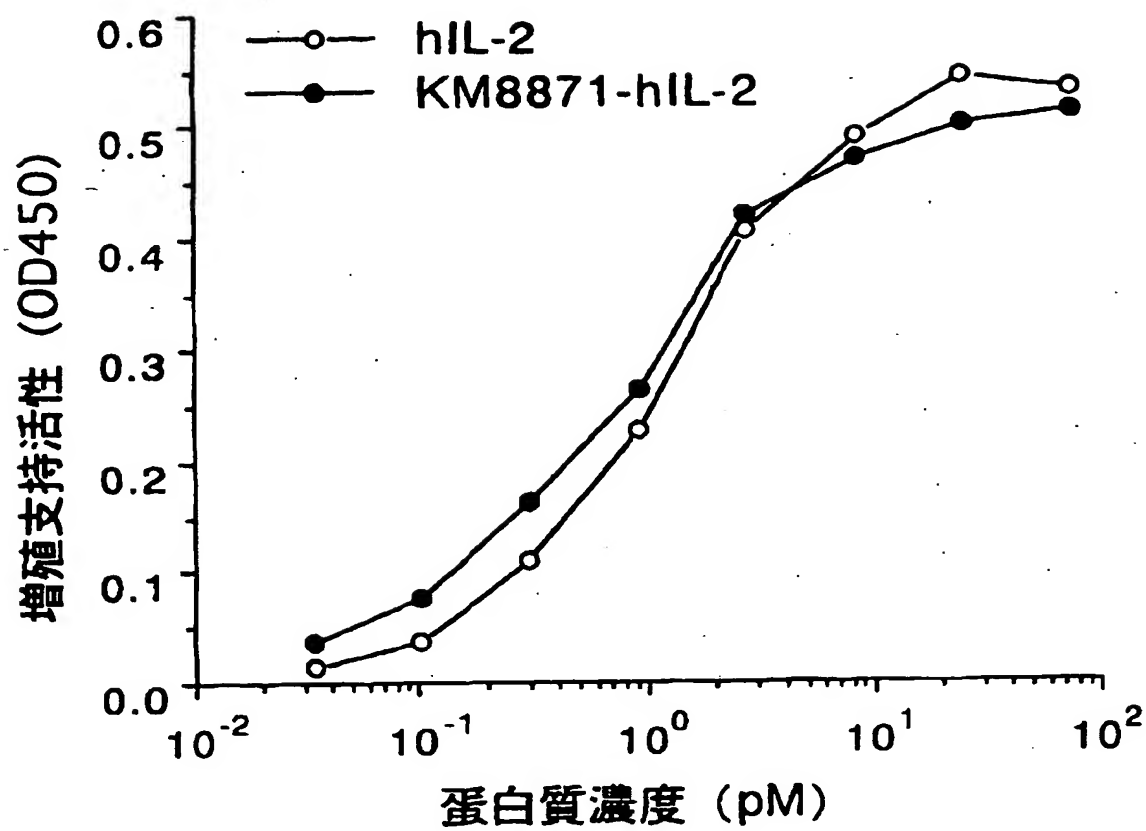


G361細胞



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 28

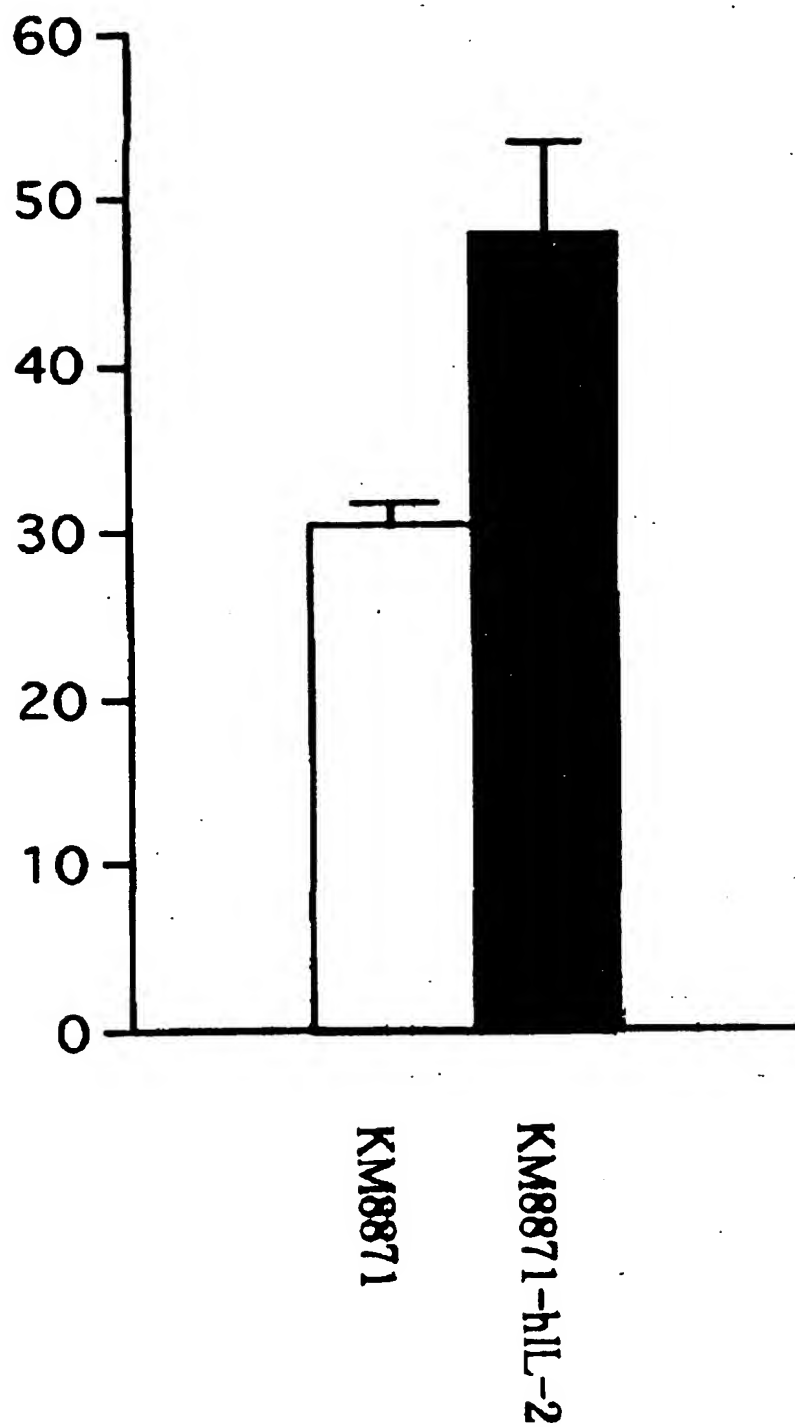


THIS PAGE BLANK (USPTO)

27 / 41

☒ 29

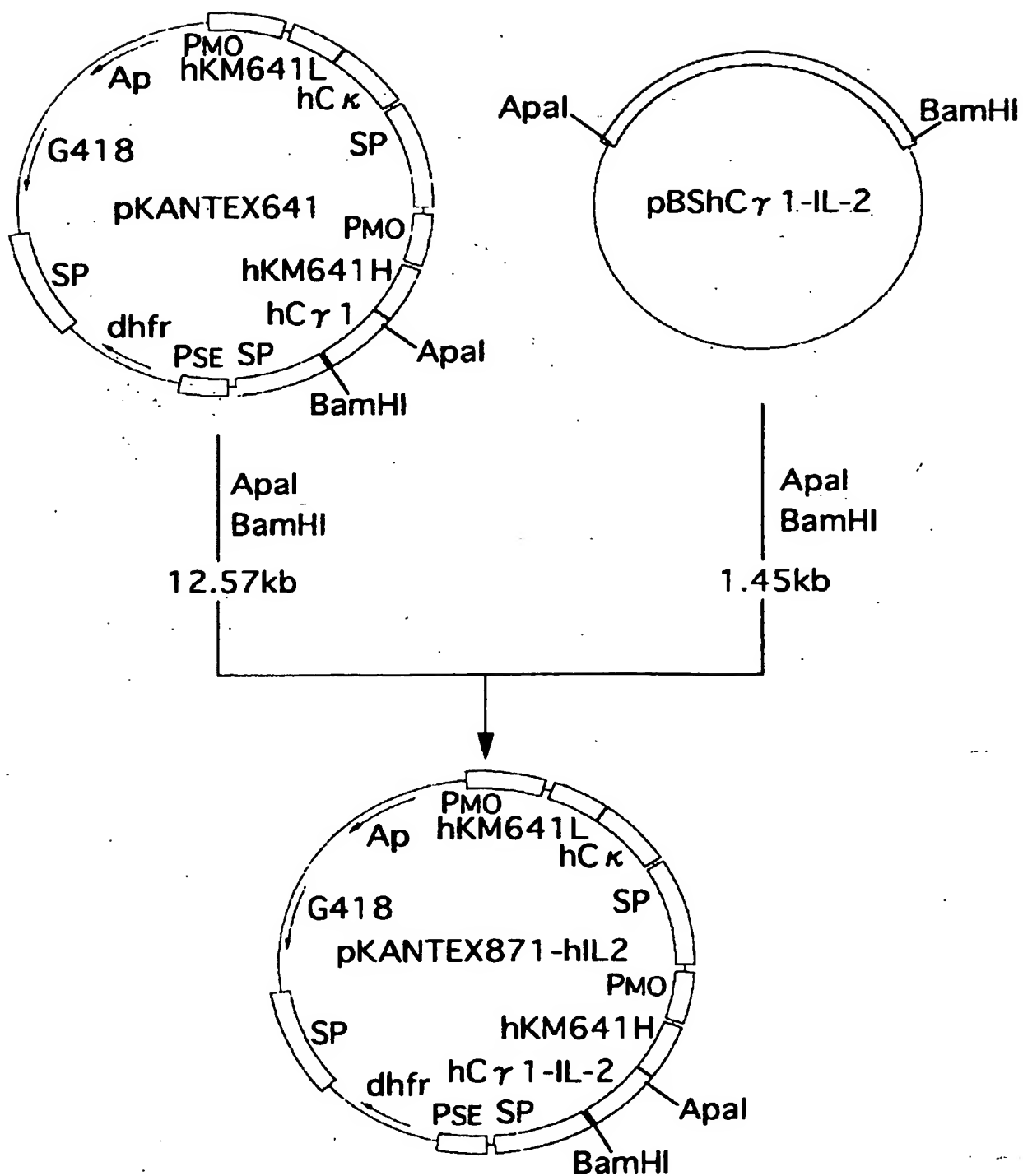
細胞障害活性(%)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

28 / 41

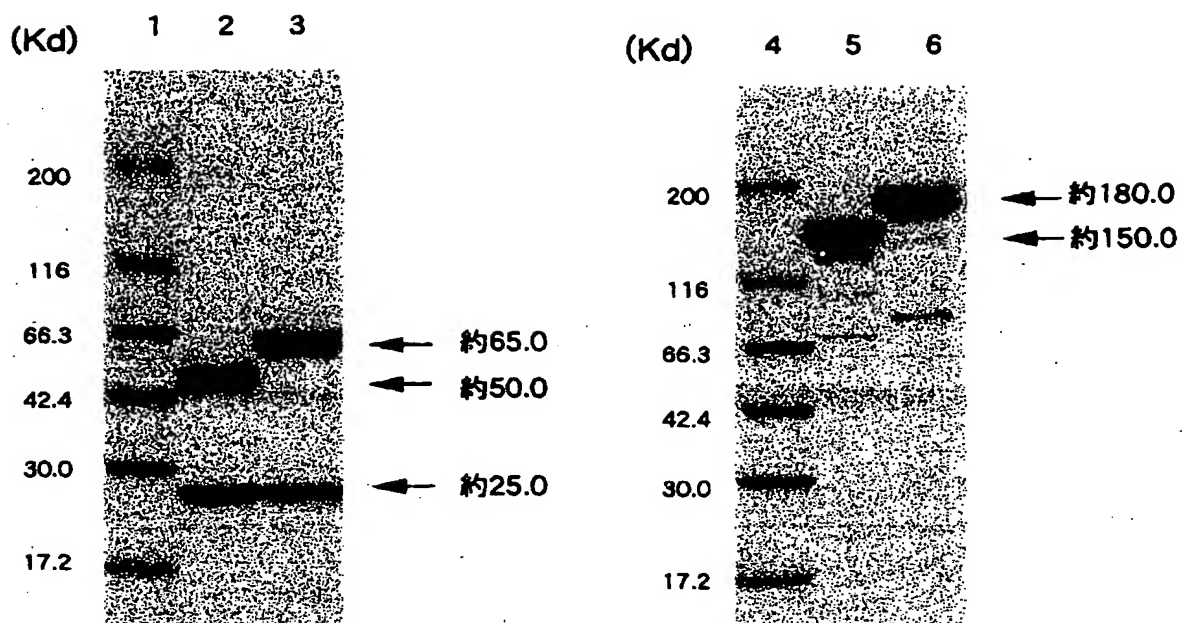
☒ 30



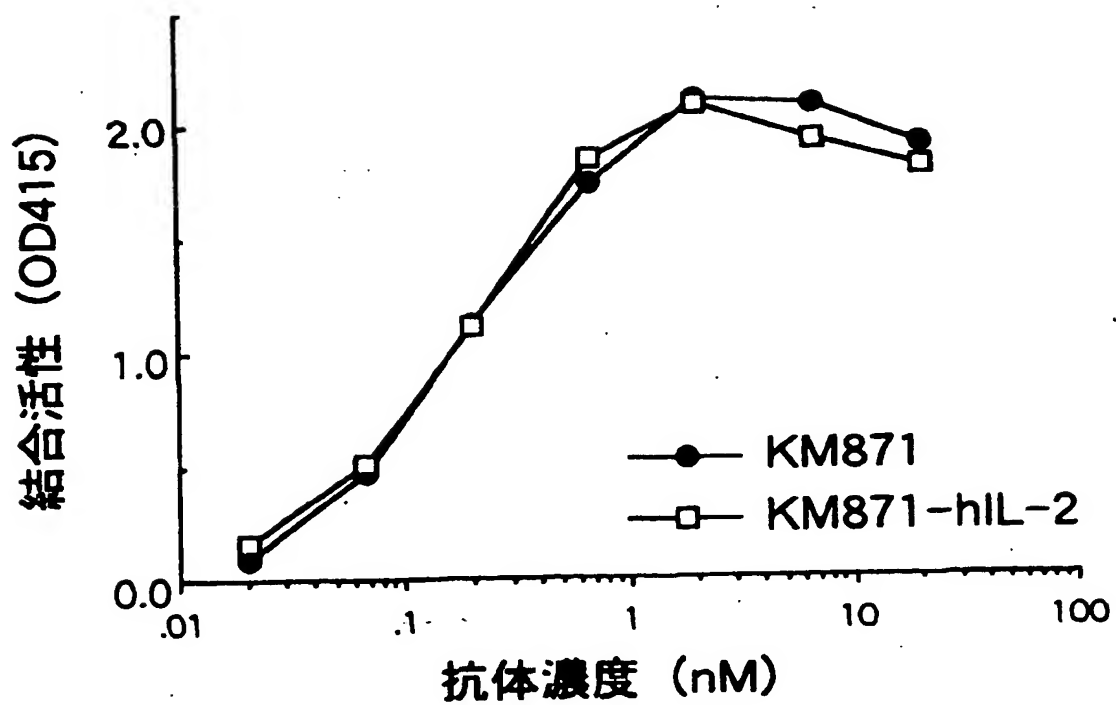
THIS PAGE BLANK (USPTO)

29 / 41

☒ 3 1



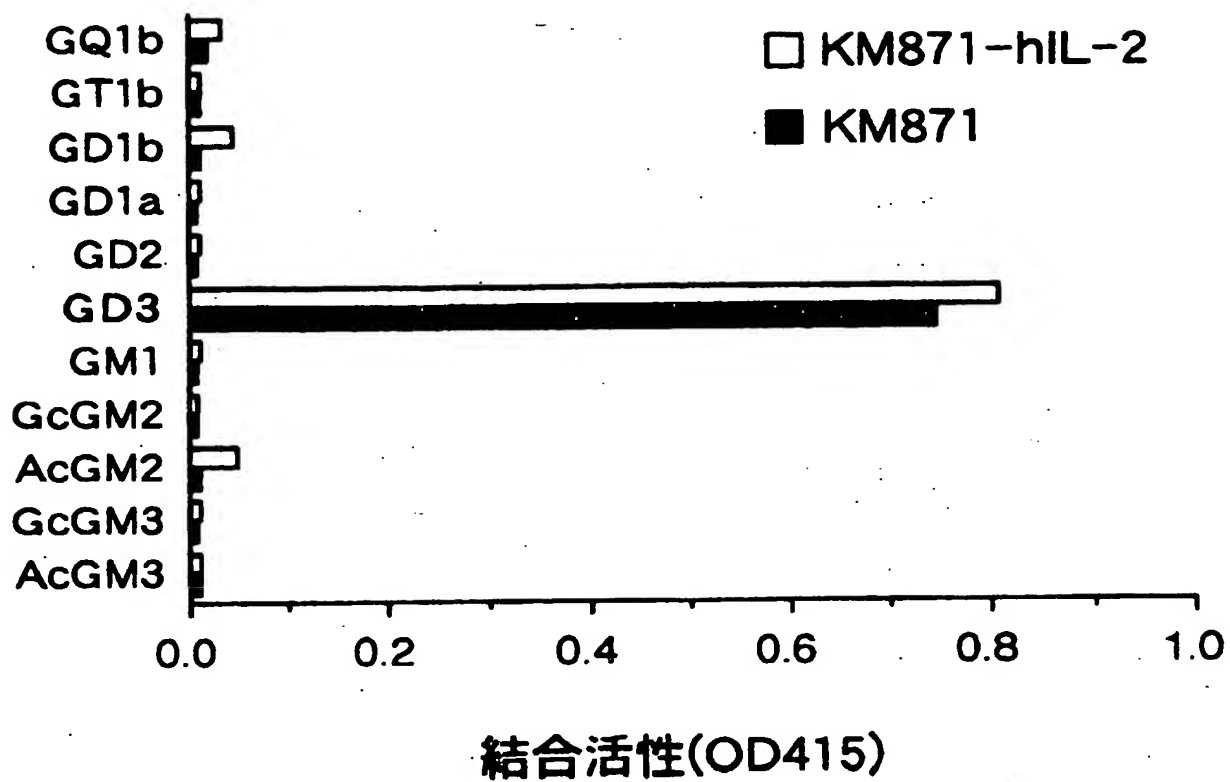
☒ 3 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

30 / 41

図 33

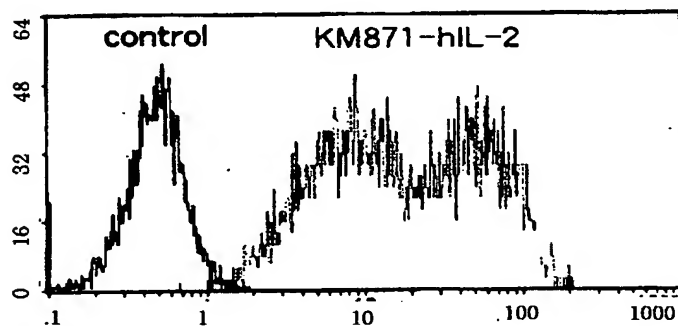
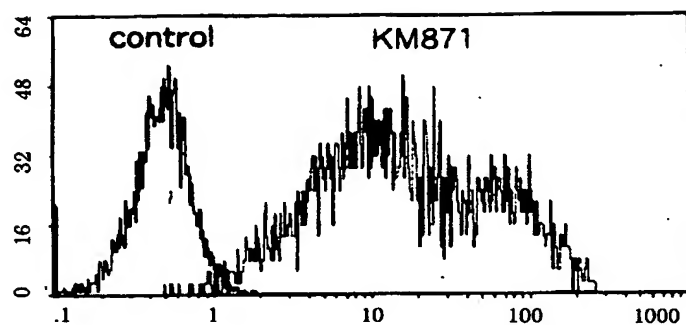


THIS PAGE BLANK (USPTO)

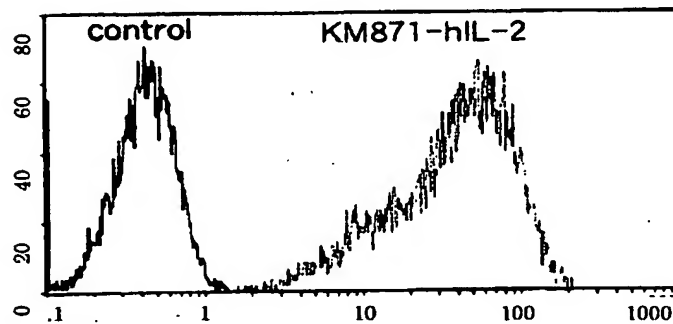
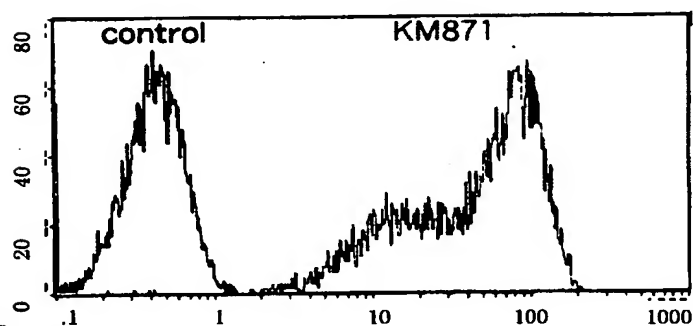
31 / 41

☒ 3 4

G361細胞



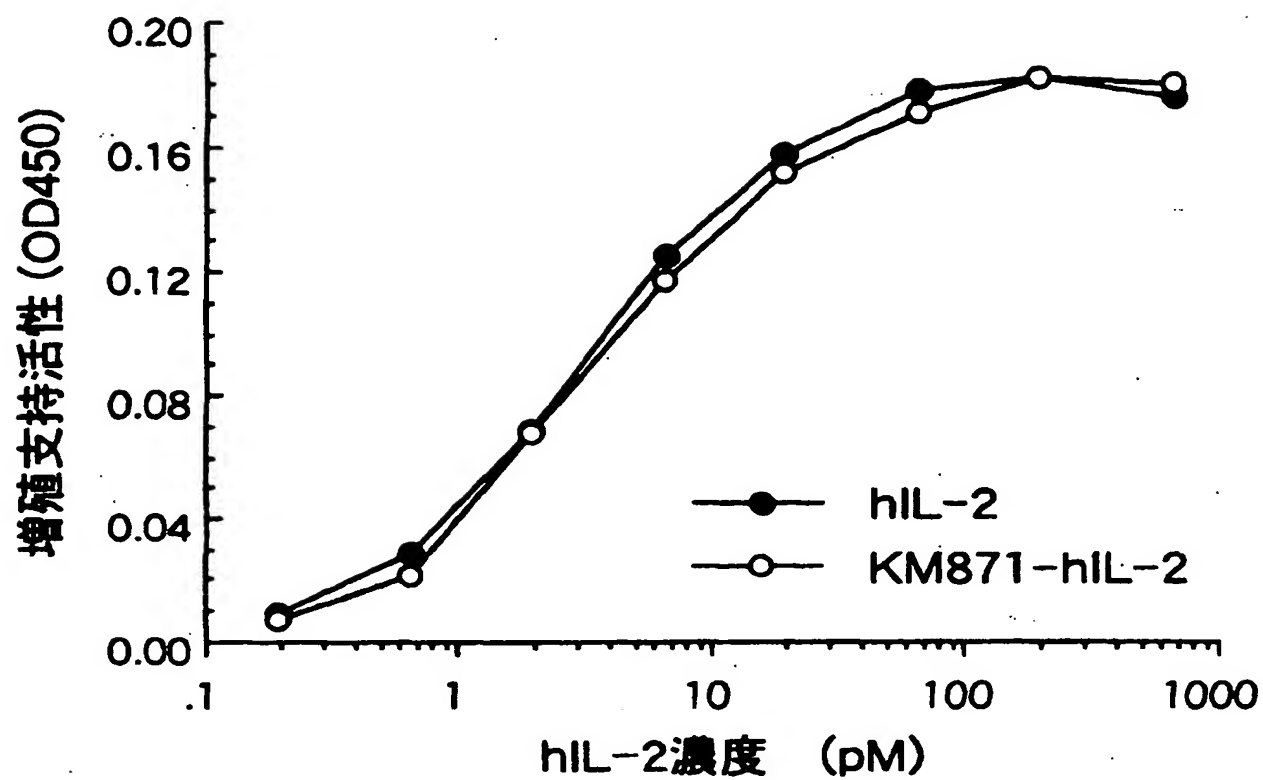
SK-MEL-28細胞



THIS PAGE BLANK (USPTO)

32 / 41

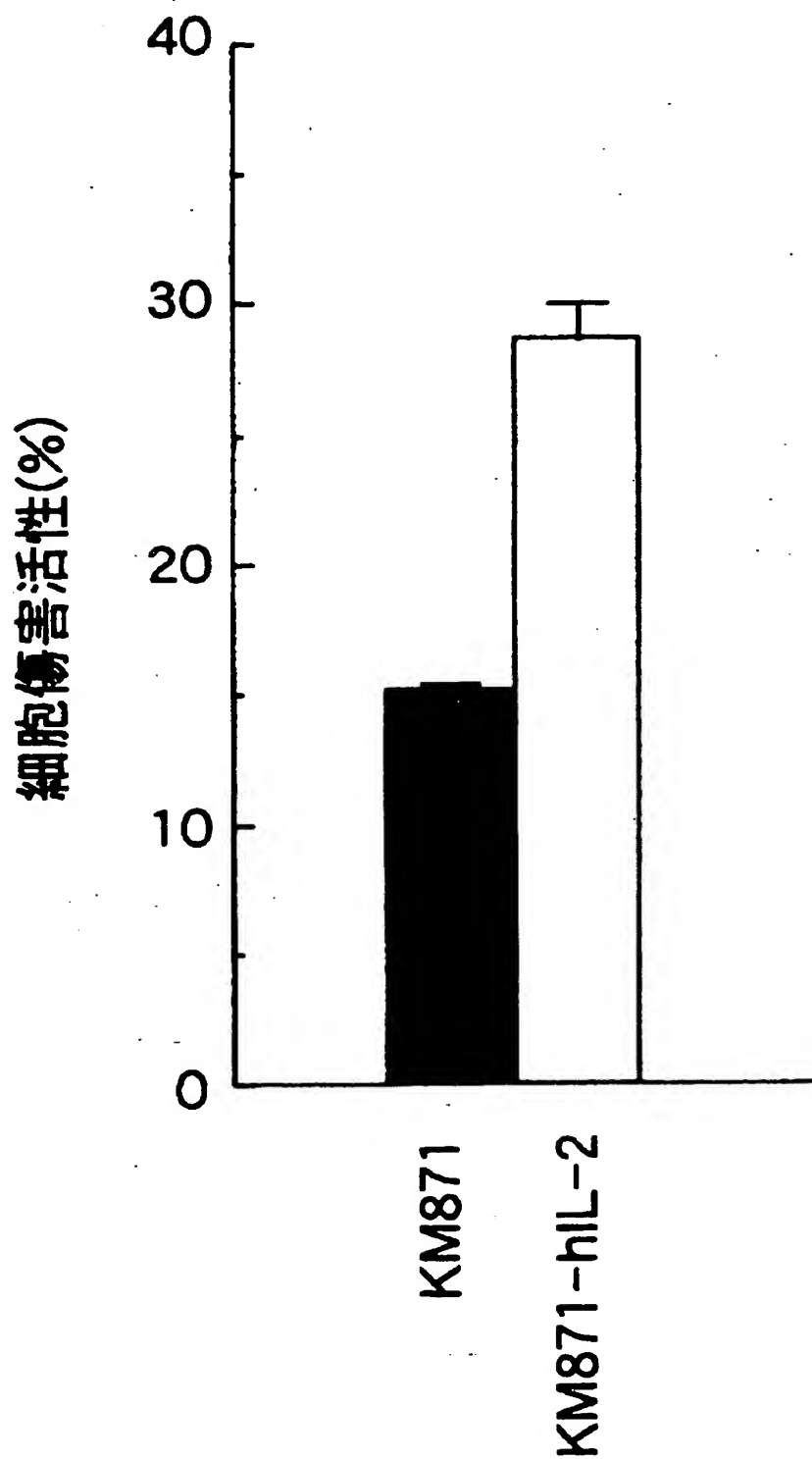
☒ 3 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

33 / 41

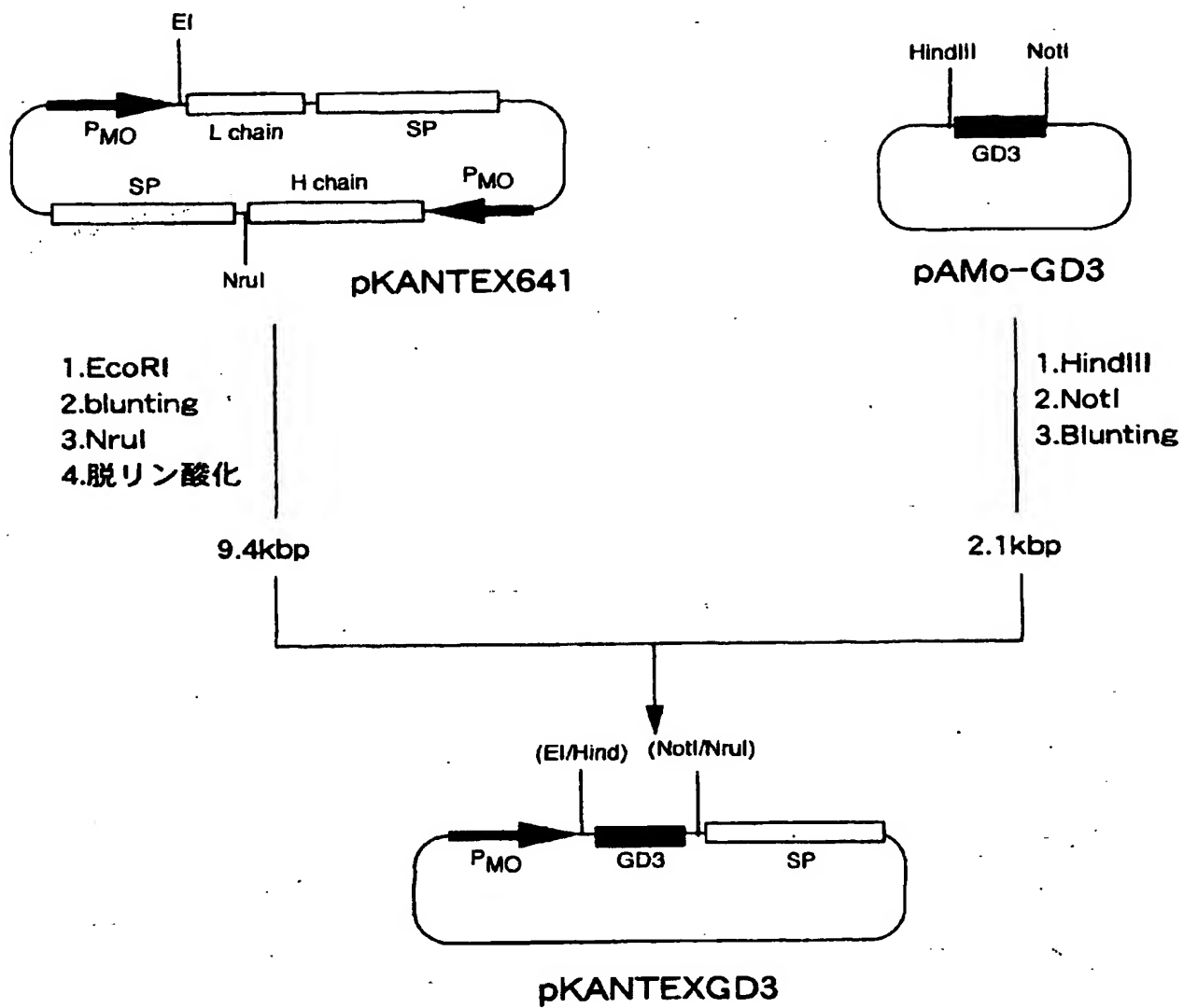
☒ 3 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

34 / 41

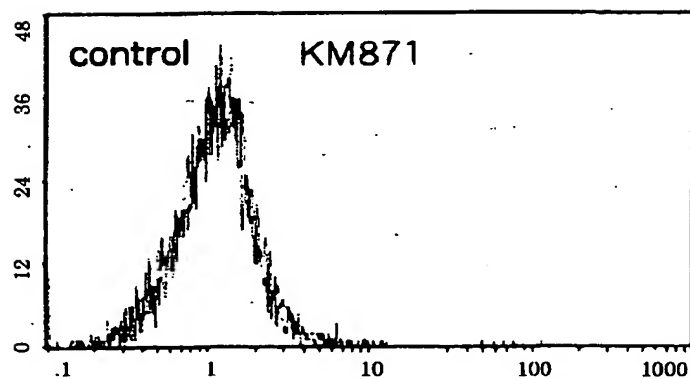
図 37



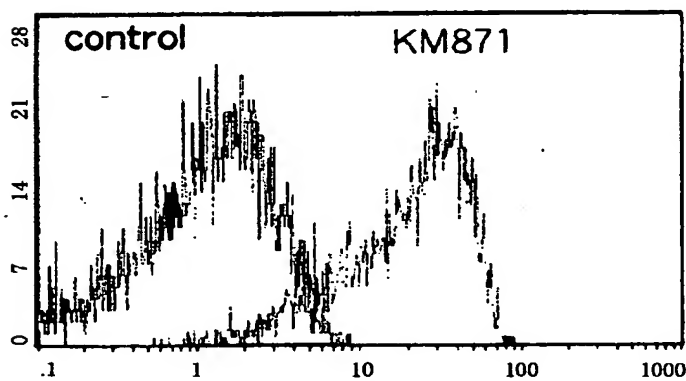
THIS PAGE BLANK (USPTO)

35 / 41

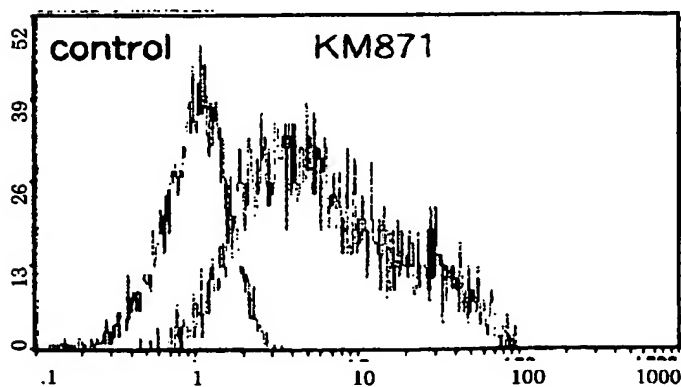
☒ 38



B16 · F10 (親株)



B16 · 29-10

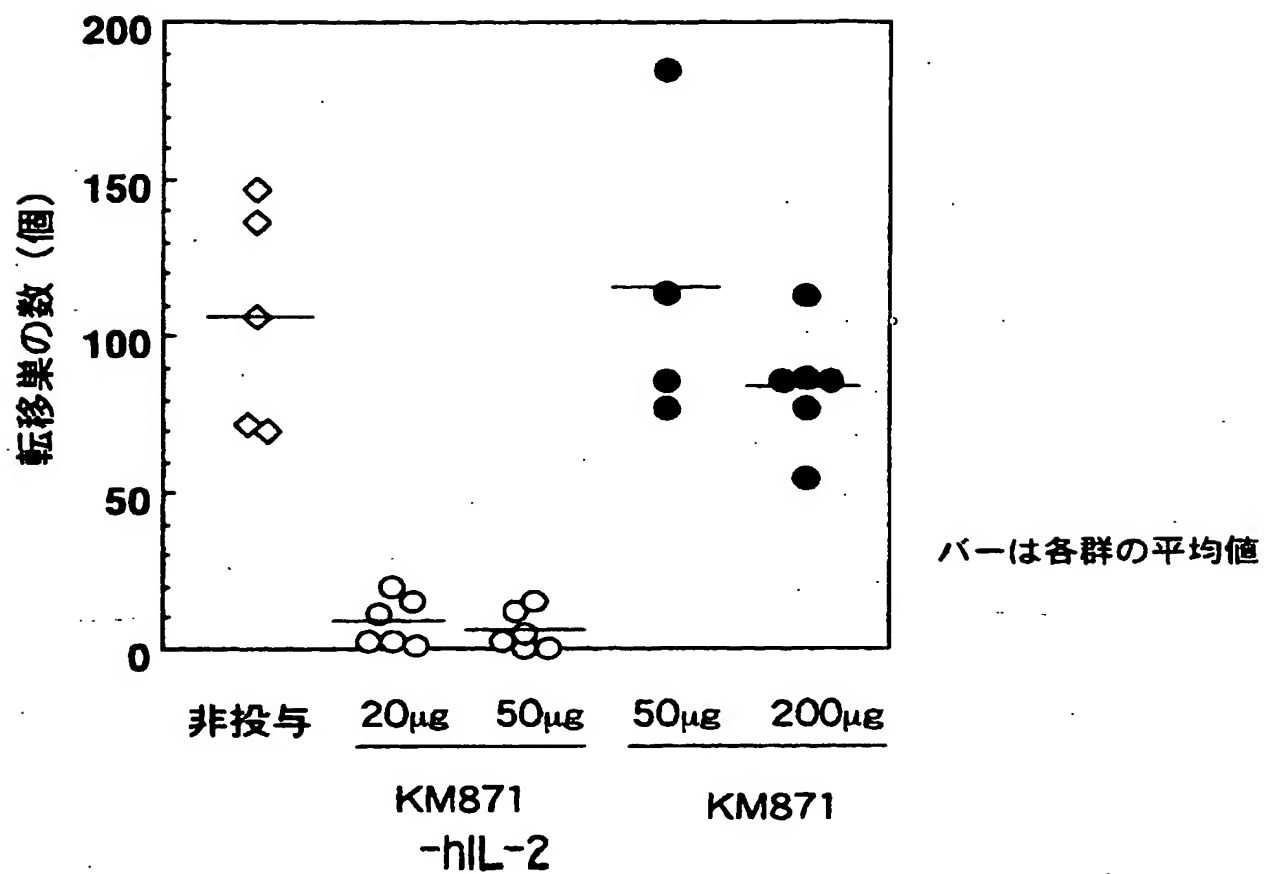


B16 · 8-3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

36 / 41

図 39



THIS PAGE BLANK (USPTO)

37 / 41

図 40

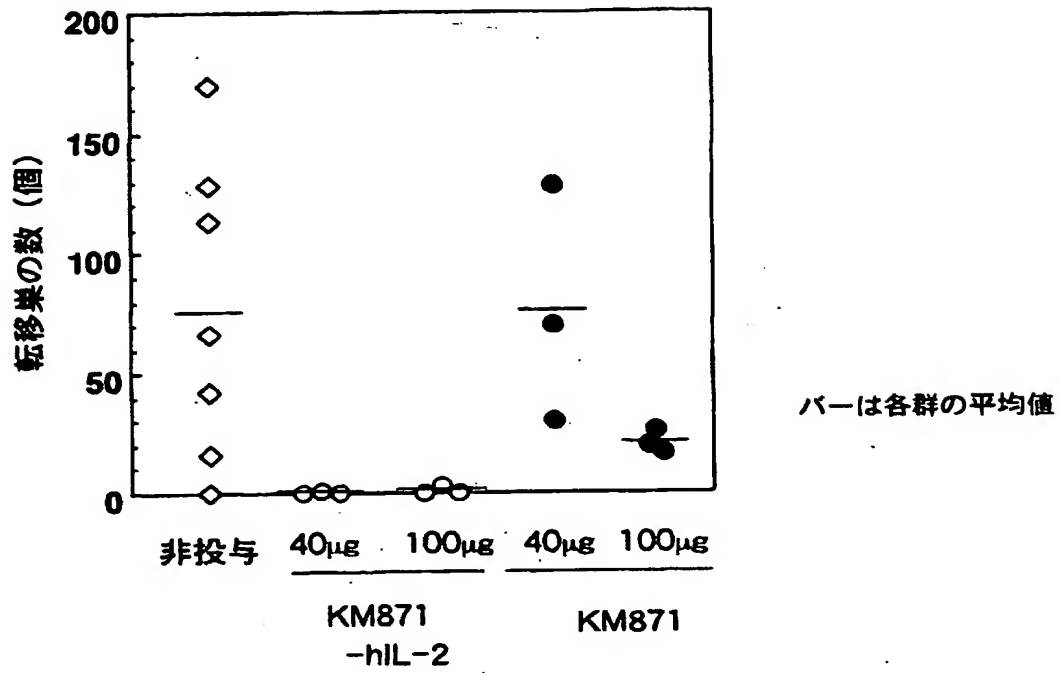
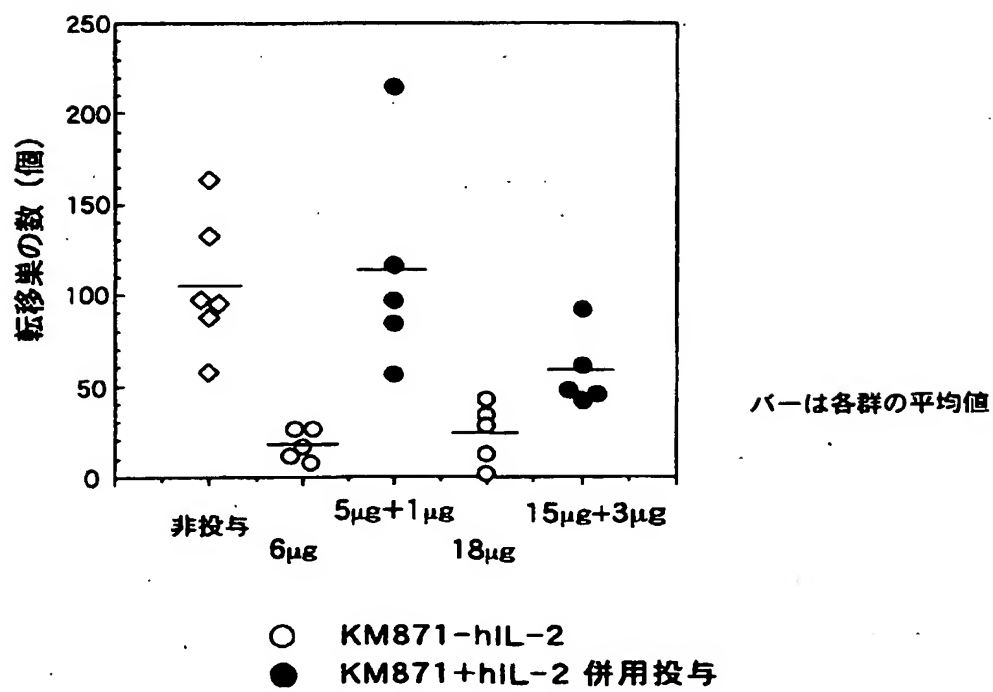


図 41



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 4 2

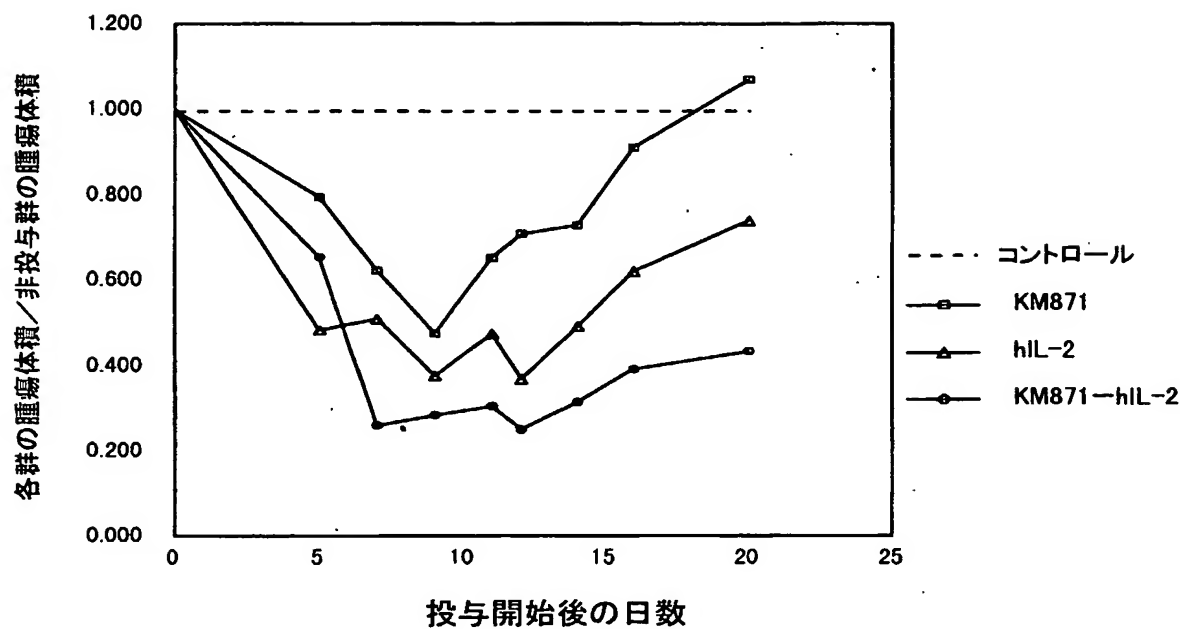
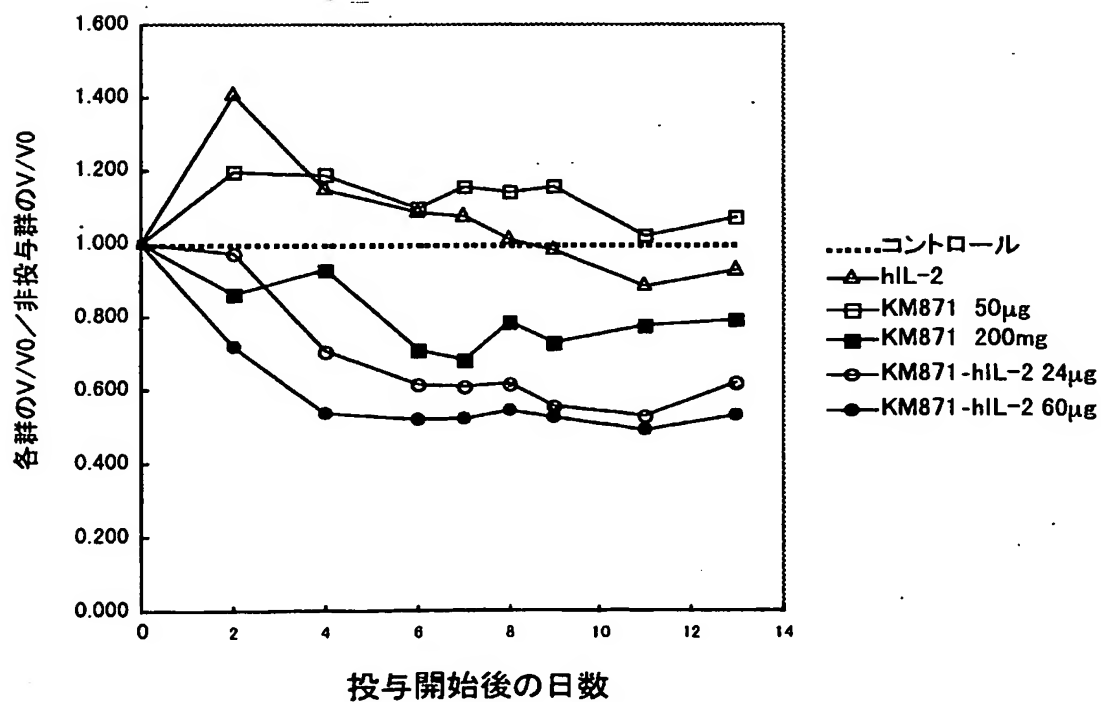
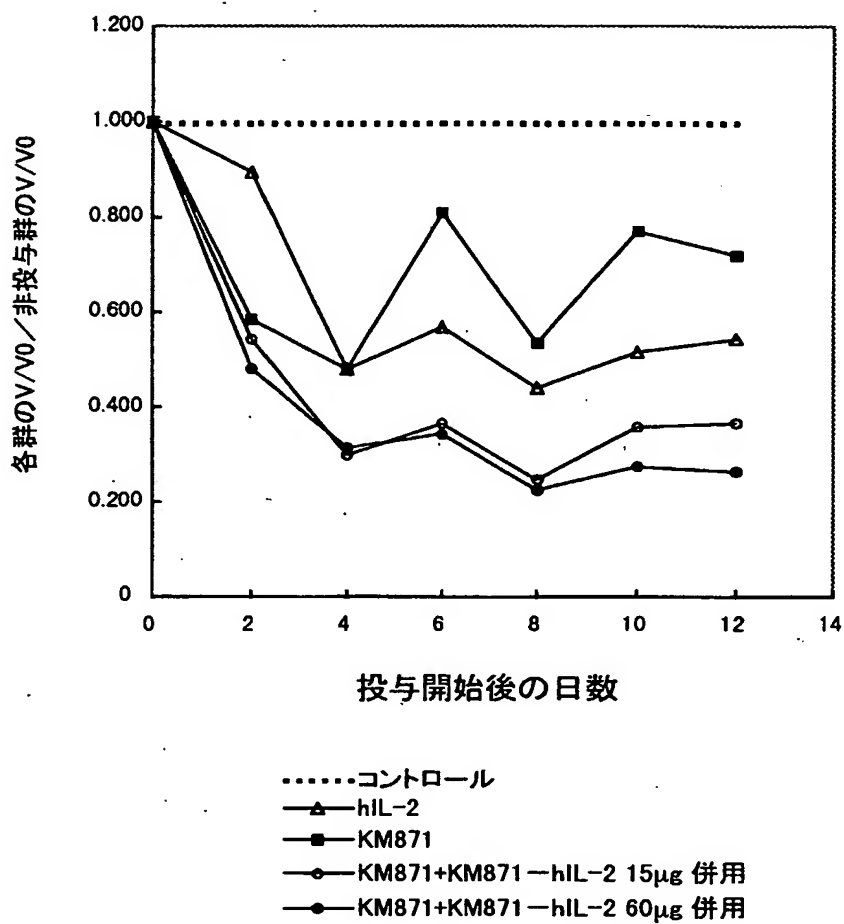


図 4 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 44



THIS PAGE BLANK (USPTO)

40 / 41

図 4 5

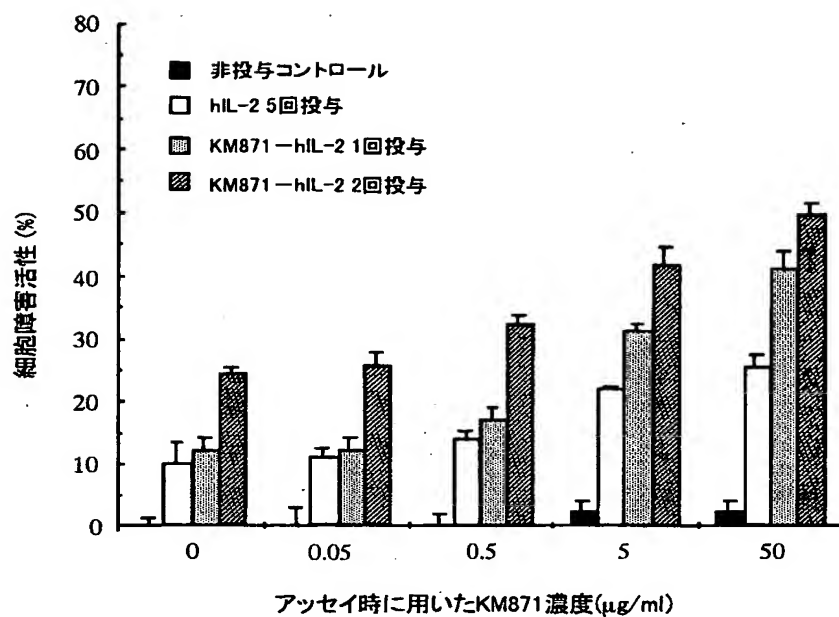
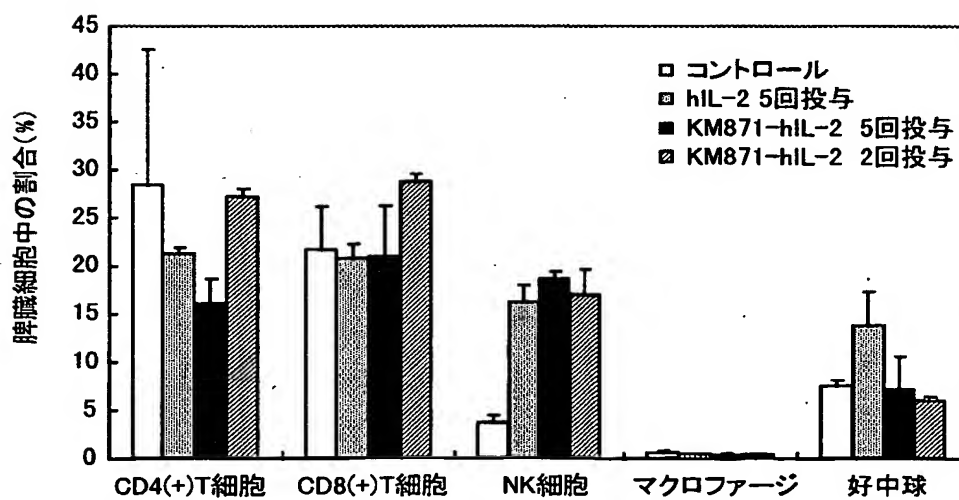


図 4 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

41 / 41

図 4 7

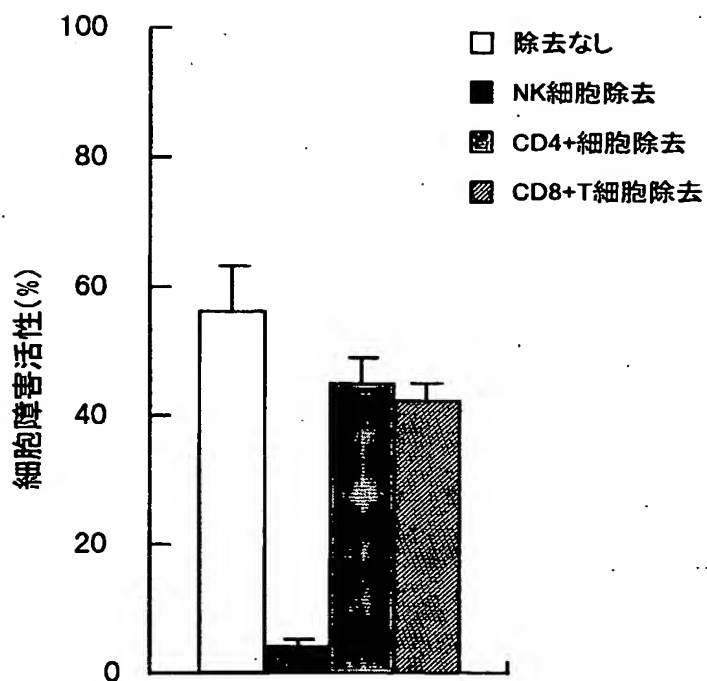
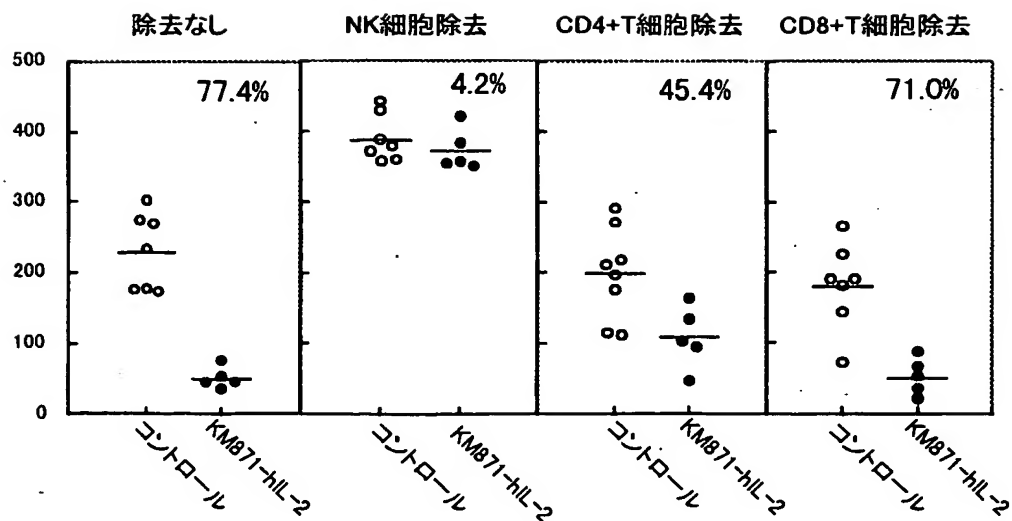


図 4 8



縦軸: 転移巣の数 バー: 各群の平均値
 グラフ中の数値: KM871-hIL-2投与による転移阻害率

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 42

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Humanized anti-GD3 antibody and it's cytokine conjugate

<130>11239W01

<140>

<141>

<150>H11-278291

<151>1999-09-30

<160> 57

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 138

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Leu Val Phe Lys Gly

-19

-15

-10.

-5

Val Gln Cys Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Lys

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 42

-1 1

5

10

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe

15

20

25

Ser His Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu

30

35

40

45

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser

50

55

60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

65

70

75

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met

80

85

90

Tyr Phe Cys Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp

95

100

105

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

110

115

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 42

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln
-20 -15 -10 -5

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro
-1 1 5 10

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp
15 20 25

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
30 35 40

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser
45 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser
80 85 90

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
95 100 105

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 42

<400> 3

His Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 42

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr

1

5

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 42

20

25

30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7 / 42

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 11

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

caggaaacag ctatgacgcg gccgccacca tggagtttgg gctcagctgg ctttttcttg 60
tccttgtttt caaaggtggt cagtgtgagg tgcag 95

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8 / 42

<210> 12

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 12

aaagcgaatc cagaggctgc acaggagact ctcagagacc cccccggctg tacaaagtct 60
ccccagact ccaccagctg cacctcacac tgaacac 97

<210> 13

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 13

gcagcctctg gattcgcttt cagtcattat gccatgtctt gggtcgccca ggctccaggg 60
aaggggctgg agtgggtggc ttatattagt agtgggtgg 98

<210> 14

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9 / 42

gatacagcgt gttcttggag ttatctctgg agatggtgaa tctgcccttt acactgtctg 60
aatagtaggt gccactacca ccactactaa tataagc 97

<210> 15

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 15

ctccaagaac acgctgtatc tgcaaatgcg cagcctgaga gctgaggact cggctgtgta 60
tttctgtaca agagttaaac tgggaaccta ctactttg 98

<210> 16

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 16

gttttccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgagc agggttccct 60
ggccccagga gtcaaagtag taggttccca gt 92

<210> 17

<211> 94

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10 / 42

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 17

caggaaacag ctatgacgaa ttccaccatg atgtcctctg ctcagttcct tggctctctg 60
ttgctctgtt ttcaaggtac cagatgtgac atcc 94

<210> 18

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 18

gcactacaag tgatggtgac tctgtctcct acagatgcag acagggagga tggagactgg 60
gtcatctgga tgcacatct ggtacct 87

<210> 19

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 19

gtcaccatca cttgtagtgc aagtcaggac attagtaatt atttaaactg gtatcagcag 60
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgat 89

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11 / 42

<210> 20

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 20

taatctgtcc cagatccacc gccgctgaac cttgatggga ccccgagtg taaatttgat 60
gagtaaaaga tcaggagctt aggggcttt 89

<210> 21

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 21

ggtggatctg ggacagatta tactctcacc atcagcagcc tgcagcctga agattttgca 60
acttattact gtcatcagta tagtaagctt cc 92

<210> 22

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 22

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12 / 42

gttttcccag tcacgaccgt acgtttaatc tctaccttgg tcccctggcc gaacgtccac 60
ggaagcttac tatactgatg 80

<210> 23

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 23

agcttccatg gacgttcggt ggaggcacca agctggaaat caaac 45

<210> 24

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 24

gtacgtttga tttccagctt ggtgcctcca ccgaacgtcc atgga 45

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13 / 42

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 25

gatgcaggca gggaggatgc agtctgggt

29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 26

accagactg catcctccct gcctgcatc

29

<210> 27

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 27

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20

-15

-10

-5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14 / 42

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag act gca tcc tcc ctg cct 96
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro

-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192
 Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240
 Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288
 Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cat cag tat agt 336
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser

80 85 90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384
 Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

95 100 105

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15 / 42

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 28

actgatgaca gaaataagtt gcaaaa

26

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 29

ttttgcaact tatttctgtc atcagt

26

<210> 30

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16 / 42

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48
 Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
 -20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 -1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp
 15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192
 Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240
 Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288
 Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat ttc tgt cat cag tat agt 336
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser
 80 85 90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384
 Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17 / 42

95

100

105

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 31

ggagcttaac ggctttgtct ggtttctg

28

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 32

cagaaaccag acaaagccgt taagctcc

28

<210> 33

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18 / 42

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 33

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48
 Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
 -20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 -1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp
 15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca gac aaa gcc gtt 192
 Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Lys Ala Val
 30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240
 Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288
 Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cat cag tat agt 336

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19 / 42

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser

80

85

90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

95

100

105

<210> 34

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 34

gttgcgatat cttcaggctg cagattgctg atggtgagac tataatct

48

<210> 35

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 35

agattatagt ctcaccatca gcaatctgca gcctgaagat atcgcaac

48

<210> 36

THIS PAGE BLANK (USPTO)

20 / 42

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 36

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
-20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp
15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192
Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240
Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser
45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat agt ctc acc atc agc 288

THIS PAGE BLANK (USPTO)

21 / 42

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

aat ctg cag cct gaa gat atc gca act tat tac tgt cat cag tat agt 336
 Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser
 80 85 90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384
 Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 95 100 105

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 37

ttcaggctgc agattgctga tgggtg

25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

22 / 42

caccatcagc aatctgcagc ctgaa

25

<210> 39

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 39

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240

THIS PAGE BLANK (USPTO)

23 / 42

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser
45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288
Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75

aat ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cat cag tat agt 336
Asn Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser
80 85 90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384
Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
95 100 105

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 40

gacagaaata agttgcgata tcttcaggct

30

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

24 / 42

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 41

agcctgaaga tatcgcaact tatttctgtc

30

<210> 42

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 42

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
-20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
-1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp
15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25 / 42

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 30 35 40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240
 Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288
 Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

agc ctg cag cct gaa gat atc gca act tat ttc tgt cat cag tat agt 336
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser
 80 85 90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384
 Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 95 100 105

<210> 43

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 43

gcactacaag tgatggtgac tctgtctcct acagatgcag gcaggaggga tgcagactgg 60
 gtcatctgga tgtcacatct ggtacct 87

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26 / 42

<210> 44

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 44

gtcaccatca cttgtagtgc aagtcaggac attagtaatt atttaaactg gtatcagcag 60
aaaccaggga aagccgtaa gctcctgat 89

<210> 45

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 45

taatctgtcc cagatccacc gccgctgaac cttgatggga cccccgagtg taaatttgat 60
gagtaaaaga tcaggagctt aacggcttt 89

<210> 46

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

27 / 42

<400> 46

ggtggatctg ggacagatta tactctcacc atcagcagcc tgcagcctga agattttgca 60
 acttatttct gtcacagta tagtaagctt cc 92

<210> 47

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 47

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48
 Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
 -20 -15 -10 -5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct gca tcc tcc ctg cct 96
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ala Ser Ser Leu Pro
 -1 1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp
 15 20 25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc gtt 192
 Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val

THIS PAGE BLANK (USPTO)

28 / 42

30

35

40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240
Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser
45 50 55 60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288
Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75

agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat ttc tgt cat cag tat agt 336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser
80 85 90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384
Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
95 100 105

<210> 48

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 48

THIS PAGE BLANK (USPTO)

29 / 42

atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt ctc ctg ttg ctc tgt ttt caa 48

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln

-20

-15

-10

-5

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

-1 1

5

10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gca agt cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp

15

20

25

att agt aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca gac aaa gcc gtt 192

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Lys Ala Val

30

35

40

aag ctc ctg atc ttt tac tca tca aat tta cac tcg ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser

45

50

55

60

agg ttc agc ggc ggt gga tct ggg aca gat tat act ctc acc atc agc 288

Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

agc ctg cag cct gaa gat atc gca act tat ttc tgt cat cag tat agt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser

80

85

90

aag ctt ccg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gta gag att aaa cgt 384

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

THIS PAGE BLANK (USE)

30 / 42

95

100

105

<210> 49

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 49

catgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctcccggggg 60
agaattcatt gatcag 76

<210> 50

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 50

gatcctgatac aatgaattct cccccggggag acagggagag gctcttctgc gtgtagtggt 60
tgtgcagagc ctcatgcatg gggcc 85

<210> 51

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

31 / 42

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 51

gtctcccgga aaagcaccta ctagtagttc tacaaag

37

<210> 52

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 52

ccctgatcaa tgaattcaag tcagtgttga gatgatgc

38

<210> 53

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 53

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

32 / 42

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115

120

125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130

135

140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145

150

155

160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165

170

175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180

185

190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195

200

205

THIS PAGE BLANK (USPTO)

33 / 42

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210

215

220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225

230

235

240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245

250

255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260

265

270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275

280

285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290

295

300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305

310

315

320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325

330

335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340

345

350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355

360

365

THIS PAGE BLANK (USPTO)

34 / 42

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370

375

380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385

390

395

400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405

410

415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420

425

430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435

440

445

Lys Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu

450

455

460

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr

465

470

475

480

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro

485

490

495

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu

500

505

510

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His

515

520

525

THIS PAGE BLANK (USPTO)

35 / 42

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu

530

535

540

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr

545

550

555

560

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser

565

570

575

Ile Ile Ser Thr Leu Thr

580

<210> 54

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

36 / 42

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 55

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

37 / 42

Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

38 / 42

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 57

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 57

Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr

20

25

30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys

85

90

95

THIS PAGE BLANK (USPTO)

39 / 42

Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

THIS PAGE BLANK (USPTO)

40 / 42

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

THIS PAGE BLANK (USPTO)

41 / 42

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
450 455 460

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
465 470 475 480

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
485 490 495

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
500 505 510

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
515 520 525

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
530 535 540

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
545 550 555 560

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
565 570 575

THIS PAGE BLANK (USPTO)

42 / 42

Ile Ile Ser Thr Leu Thr

580

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP00/06774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K16/28, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K16/28, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Webber K. et al. "Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-tac antibody: comparison with its single-chain analog", Molecular Immunology, Vol.32 (1995), pp.249-258	1-66
Y	JP, 5-304989, A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 19 November, 1993 (19.11.93) & US, 5750078, A & EP, 533199, A	1-66
Y	Moutel S. et al., "Generation and characterization of a mouse single-chain antibody fragment specific for disialoganglioside (GD2)", Hybridoma, Vol.16 (1997) pp.335-346	1-66
Y	Morrison SL. et al., "Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol.81 (1984) pp.6851-6855	1-66
Y	Jones PT. et al., "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse", Nature, Vol.321 (1986)	1-66

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 December, 2000 (19.12.00)Date of mailing of the international search report
30 January, 2001 (30.01.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06774

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	pp. 522-525	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C07K16/28, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P35/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C07K16/28, C12P21/08, C12N15/13, C12N5/10, A61K39/395, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Webber K. et al. "Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-tac antibody: comparison with its single-chain analog" Molecular Immunology, 第32巻 (1995) p. 249-258	1-66
Y	JP, 5-304989, A (協和醗酵工業株式会社) 19. 11月. 1993 (19. 11. 93) & US, 5750078, A & EP, 533199, A	1-66
Y	Moutel S. et al. "Generation and characterization of a mouse single-chain antibody fragment specific for	1-66
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 19. 12. 00	国際調査報告の発送日 30.01.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩	4B 9050 印
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

（続き） 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	disialoganglioside (GD2)" Hybridoma, 第16巻 (1997) p. 335-346	
Y	Morrison SL. et al. "Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 第81巻 (1984) p. 6851-6855	1-66
Y	Jones PT. et al. "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse" Nature, 第321巻 (1986)) p. 522-525	1-66